

DISSERTATION IM FACH BIOLOGIE

**Erkennung apoptotischer Neurone durch
Mikrogliazellen *in vitro***

Zur Erlangung des akademischen Grades **doctor rerum naturalium**

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Institut für Biologie

Dipl.-Biologin Anke Witting geb. am 14.03.1972 in Barßel

Dekan der Fakultät Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter: 1. Prof. A. Herrmann
 2. Prof. H. Kettenmann
 3. Prof. R. Nitsch

eingereicht: 19.07.2000

Datum der Promotion: 21.11.2000

Zusammenfassung

Mikrogliazellen stellen die professionellen Phagozyten des zentralen Nervensystems dar und sind maßgeblich bei der Entfernung apoptotischer Neurone aus dem Gewebe beteiligt. Die Erkennungsmechanismen, die zu einer Erkennung und Phagozytose apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen führen, sind bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines Kokulturmodells die Erkennungsmechanismen zwischen primären Mikrogliazellen und apoptotischen Kleinhirnneuronen untersucht. Der apoptotische Zelltod, charakterisiert durch Schrumpfung und Fragmentation der Neuron, durch Kondensation des Chromatins, durch Fragmentation der DNA und durch Präsentation von Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, wurde in den Kleinhirnneuronen durch eine Behandlung mit 100 μ M S-Nitrosocystein induziert. Es konnte gezeigt werden, daß apoptotische Neurone keine löslichen Substanzen sekretierten, die chemotaktisch auf Mikrogliazellen wirken. Dies zeigt, daß die Erkennung apoptotischer Neurone über Zell-Zell-Kontakte erfolgt. Zur Untersuchung der beteiligten Erkennungsmechanismen wurden Mikrogliazellen zwei Stunden nach der Induktion des apoptotischen Zelltods zu den Neuronen gegeben und für sechs Stunden in Gegenwart oder Abwesenheit von Liganden kultiviert, die mögliche Rezeptoren zur Erkennung von apoptotischen Neuronen inhibieren. Die Bindung/Phagozytose der apoptotischen Kleinhirnneurone durch Mikrogliazellen wurde mit einer kombinierten DAPI/Propidiumjodid (für apoptotische/nekrotische Zellen) und einer Lektin Färbung (für Mikrogliazellen) durch Auszählung bestimmt. Die Aufnahme apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen wurde durch Galaktose und N-Acetylglukosamin reduziert, was auf eine Erkennung apoptotischer Zellen durch Lektine hindeutet. Weiterhin weist der inhibitorische Effekt von RGDS-Peptiden auf die Bindung/Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen auf eine Erkennung durch ein Vitronektinrezeptor hin. Da Mikrogliazellen spezifisch Lipidvesikel, die mit Phosphatidylserin angereichert waren, binden und O-Phospho-L-Serin die Aufnahme von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen deutlich inhibierte, erfolgte die Erkennung apoptotischer Neurone hauptsächlich durch einen Phosphatidylserin Rezeptor. Die Expression des PS-Rezeptors auf Mikrogliazellen ist unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikrogliazellen *in vitro*. Die Bindung von PS ist mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in der Mikrogliazelle verbunden und führt nicht zu einer sekretorischen Aktivierung der Mikrogliazelle. Da Astrozyten ebenfalls einen PS-Rezeptor exprimieren, könnten sie als

semiprofessionelle Phagozyten ebenfalls eine Bedeutung bei der Aufnahme apoptotischer Neurone einnehmen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß apoptotische Neurone ein komplexes Oberflächenmuster exprimieren, welches durch unterschiedliche Rezeptorsysteme der Mikrogliazelle erkannt werden kann. Die Erkennung von PS auf apoptotischen Neuronen durch Mikroglia scheint bei diesen untersuchten Rezeptorsystemen die wichtigste Rolle zu spielen.

Schlagwörter

Mikrogliazellen, Apoptose, Erkennungsmechanismen, Kleinhirnneurone

Abstract

Microglia are the professional phagocytes of the central nervous system and play a crucial role in removal of apoptotic neurons out of the tissue. The recognition mechanisms leading to the recognition and phagocytosis of these apoptotic neurons by microglia are not yet characterized. Here, in the present work, a co-culture model was established to examine the receptor systems involved in the recognition of apoptotic cerebellar neurons by primary microglia. Treatment with 100 μ M S-nitrosocysteine induced apoptosis of cerebellar neurons as indicated by condensation and fragmentation of the neurons, condensation of the chromatin, fragmentation of the DNA and phosphatidylserine exposure to the exoplasmic leaflet of the plasma membrane. It was shown that apoptotic neurons do not release soluble signals that serve to attract microglia. Consequently, contact-dependent interaction between the microglial cell and the apoptotic neuron is required for recognition. For the examination of the receptor systems involved in recognition, microglial cells were added to neurons 2 h after induction of apoptosis and co-cultured for 6 h in the presence of ligands that inhibit recognition by binding to their respective receptors. Binding/phagocytosis was determined after combined DAPI/propidium iodide (for apoptotic/necrotic neurons) and lectin staining (for microglia). Uptake of neurons was reduced by galactose or N-acetylglucosamine, suggesting that recognition involves lectins. Furthermore, the inhibition of microglial binding/uptake of apoptotic neurons by RGDS peptide suggested the involvement of a microglial vitronectin receptor. The selective binding of phosphatidylserine-enriched lipid vesicles on microglial cells and the strong interference of O-phospho-L-serine with the uptake of apoptotic neurons was indicative of an important role for the phosphatidylserine receptor (PS-receptor). As microglia selectively bind lipid vesicles enriched in phosphatidylserine and O-phospho-L-serine interfered in a strong way with the uptake of apoptotic neurons, the recognition of apoptotic neurons is mainly dependent on a phosphatidylserine receptor. The expression of the PS-receptor is independent of the activation state of the microglial cell *in vitro*. The binding of PS induces an elevation of the intracellular calcium concentration in the microglia but does not induce an activation or secretion of (Liste der getesteten Zytokine einsetzen) of the microglial cell in a secretory way. Because of the expression of a PS-receptor, Astrocytes could also play a role in the uptake of apoptotic neurons as semiprofessional phagocytes.

In summary, collectively, these results suggest that apoptotic neurons generate a complex surface signal recognized by different receptor systems on microglia. The recognition of

PS on the surface of apoptotic neurons by microglial cells seems to play a major role in the recognition of these apoptotic neurons cells..

Keywords:

Microglia, apoptosis, recognition, cerebellar neurons

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Kettenmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und der sehr guten Arbeitsbedingungen sowie bei Dr. Christiane Nolte für die sehr gute Betreuung der Arbeit, ihre Anregungen beim Schreiben des Manuskripts und ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen Problemen.

Danken möchte ich Prof. Dr. Andreas Herrmann für die Übernahme des Gutachtens.

Die Untersuchungen mit Hilfe der Lipidvesikel wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Herrmann und Dr. Peter Müller aus der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Ihnen danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitstellung der Lipidvesikel.

Dr. Uwe-Karsten Hanisch möchte ich für die Hilfe und die Hinweise zur Durchführung der Zytokin- und Chemokin- Experimente danken.

Für die sehr gute technische Unterstützung danke ich Brigitte Hunger, Herdis Arlt und Gerda Müller für die Arbeiten in der Zellkultur, Christiane Grass für diverse Laborarbeiten, Silke Fleischauer für die Unterstützung bei den ELISA-Experimenten und Hort Kagelmaker für die Unterstützung bei technischen und mechanischen Fragestellungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Zelluläre Neurobiologie“ des MDC Berlin für die kooperative und freundliche Arbeitsatmosphäre, besonders Angelika Rappert für ihre Anregungen und Carsten Ohlemeyer für die moralische Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken.

Diese Arbeit wurde durch die Schering Forschungsgesellschaft finanziell unterstützt. Dafür sei herzlich gedankt.

Inhaltsangabe

1	EINLEITUNG	10
1.1	APOPTOSE UND NEKROSE	10
1.1.1	<i>Apoptose</i>	10
1.1.2	<i>Nekrose</i>	11
1.2	APOPTOSE IM NERVENSYSTEM.....	12
1.3	MIKROGLIA	9
1.4	ERKENNUNG APOPTOTISCHER ZELLEN DURCH PHAGOZYTEN	12
1.4.1	<i>Erkennungsmechanismen</i>	14
1.4.1.1	Erkennung spezifischer Zuckerstrukturen	15
1.4.1.2	Erkennung von Phosphatidylserin	16
1.4.1.3	Thrombospondin-vermittelte Erkennung.....	18
1.4.1.4	Weitere Erkennungsmechanismen.....	20
2	ZIELSTELLUNG	22
3	METHODEN.....	24
3.1	ZELLKULTUR.....	30
3.1.1	<i>Präparation der Körnerzellkulturen</i>	30
3.1.2	<i>Präparation der Mikrogliazellkulturen</i>	31
3.1.3	<i>Medien</i>	31
3.2	AUSLÖSUNG DER APOPTOSE IN KLEINHIRNNEURONEN	33
3.3	NACHWEIS UND CHARAKTERISIERUNG DES APOPTOTISCHEN ZELLTODS	33
3.3.1	<i>Untersuchung morphologischer Veränderungen mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops</i>	33
3.3.2	<i>Untersuchung der Membranintegrität und der Zellkernmorphologie mit Hilfe von DNA-Farbstoffen</i>	33
3.3.3	<i>Untersuchung der DNA-Fragmentation mit Hilfe des in situ Apoptose Detektions Tests</i>	34
3.3.4	<i>Untersuchung der Phosphatidylserin Präsentation auf der Außenseite der Plasmamembran mit Hilfe von Annexin-V</i>	35
3.4	VIDEOMIKROSKOPIE	35
3.5	MIKROCHEMOTAXIS TEST.....	36
3.6	PHAGOZYTSEASSAY	37
3.7	EFFEKT LÖSLICHER INHIBITOREN.....	38
3.8	NEUTRALROTTEST	38
3.9	BINDUNG VON LIPIDVESIKELN AN GLIAZELLEN.....	39
3.10	FREISETZUNG VON ZYTOKINEN UND CHEMOKINEN DURCH MIKROGLIA	40
3.11	MESSUNG VON ÄNDERUNGEN DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION MIT FLUORESCENZFARBSTOFFEN	41
3.12	QUANTIFIKATION/ STATISTIK.....	42

4	ERGEBNISSE	43
4.1	KLEINHIRNNEURONE ALS APOPTOTISCHES MODELLSYSTEM.....	43
4.1.1	<i>Nachweis des apoptotischen Zelltods in den Kleinhirnneuronen</i>	<i>43</i>
4.1.1.1	Nachweis der für Apoptose spezifischen morphologischen Veränderungen	44
4.1.1.2	Nachweis einer DNA-Fragmentation	44
4.1.1.3	Nachweis einer Chromatinkondensation	46
4.1.1.4	Nachweis von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran.....	48
4.2	APOPTOTISCHE NEURONE PRODUZIEREN KEINE LÖSLICHEN SIGNALE, DIE EINE CHEMOTAKTISCHE REAKTION IN MIKROGLIAZELLEN HERVORRUFEN.	50
4.3	MIKROGLIAZELLEN BINDEN/PHAGOZYTIEREN APOPTOTISCHE ZELLEN	53
4.4	IDENTIFIKATION DER BINDUNGSMECHANISMEN ZWISCHEN APOPTOTISCHEN NEURONEN UND MIKROGLIAZELLEN	55
4.4.1	<i>Spezifische Kohlenhydrate inhibieren die Bindung/Aufnahme von apoptotischen Neurone durch Mikroglia</i>	<i>56</i>
4.4.2	<i>RGDS Peptide üben einen inhibitorischen Effekt auf die Erkennung von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen aus.....</i>	<i>57</i>
4.4.3	<i>O-Phospho-L-Serin inhibiert die Bindung/Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikroglia.....</i>	<i>59</i>
4.4.4	<i>Vitalitätstest mit Neutralrot in Gegenwart der verwendeten inhibitorischen Substanzen</i>	<i>61</i>
4.5	CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHATIDYLSERINBINDUNG.....	62
4.5.1	<i>Spezifische Erkennung von Phosphatidylserin durch Mikroglia</i>	<i>62</i>
4.5.2	<i>Spezifische Erkennung von Phosphatidylserin durch Astrozyten</i>	<i>64</i>
4.5.3	<i>Zeitabhängigkeit der Bindung von Phosphatidylserin-LUVs durch Mikrogliazellen</i>	<i>65</i>
4.5.4	<i>Konzentrationsabhängige Bindung der Phosphatidylserin-LUVs an die Mikroglia</i>	<i>67</i>
4.5.5	<i>Die Bindung der Phosphatidylserin-LUVs ist unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikroglia.....</i>	<i>70</i>
4.6	DIE BINDUNG UND PHAGOZYTOSE VON PHOSPHATIDYLSERIN-LUVs IST NICHT MIT EINER AUSSCHÜTTUNG VON ZYTOKINEN UND CHEMOKINEN DURCH MIKROGLIAZELLEN VERBUNDEN	71
4.7	INDUKTION EINER ERHÖHUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION IN MIKROGLIAZELLEN DURCH PHOSPHATIDYLSERIN-LUVs	73
5	DISKUSSION.....	76
5.1	STICKSTOFFMONOXID INDUZIERT EINEN APOPTOTISCHEN ZELLTOD IN KULTIVIERTEN KLEINHIRNNEURONEN DER RATTE	76
5.2	DIREKTER ZELL-ZELL-KONTAKT IST NOTWENDIG FÜR DIE ERKENNUNG APOPTOTISCHER NEURONE DURCH MIKROGLIAZELLEN	79
5.3	MIKROGLIAZELLEN ERKENNEN UND BINDEN/PHAGOZYTIEREN APOPTOTISCHE NEURONE	80
5.4	DIE ERKENNUNG DER NEURONE DURCH MIKROGLIAZELLEN HÄNGT VON SPEZIFISCHEN KOHLENHYDRATEN AUF DER OBERFLÄCHE APOPTOTISCHER NEURONE AB	81
5.5	DIE THROMBOSPONDIN VERMITTELTE ERKENNUNG VON APOPTOTISCHEN NEURONEN DURCH MIKROGLIAZELLEN	82

5.6	DIE NEURONALE PHOSPHATIDYLSERIN PRÄSENTATION IST BETEILIGT BEI DER SPEZIFISCHEN ERKENNUNG APOPTOTISCHER NEURONE DURCH MIKROGLIAZELLEN.	84
5.7	PHOSPHATIDYLSERIN REZEPTOREN SIND KONSTITUTIV AUF DEN MIKROGLIAZELLEN EXPRIMIERT ...	86
5.8	EINE PHAGOZYTOSE VON LIPIDVESIKELN, DIE PHOSPHATIDYLSERIN ENTHALTEN, LÖST KEINE SEKRETORISCHE AKTIVIERUNG VON MIKROGLIAZELLEN AUS.....	87
5.9	ERKENNUNG UND PHAGOZYTOSE VON PHOSPHATIDYLSERIN DURCH ASTROZYTEN	88
5.10	DIE ERKENNUNG VON PHOSPHATIDYLSERIN IST MIT EINEM KALZIUMSIGNAL IN DER MIKROGLIAZELLE VERBUNDEN	88
5.11	AUSBLICK	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	91
7	LITERATURVERZEICHNIS	93

1 Einleitung

1.1 Apoptose und Nekrose

Zellen können durch Apoptose oder Nekrose sterben. Bei der Apoptose setzt ein intrazelluläres Programm den gezielten „Zell-Selbstmord“ in Gang, der in der Regel einzelne Zellen betrifft. „Die aus dem Griechischen stammende Bezeichnung Apoptose (*apoptosis*) beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das altruistische Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus“ (Stephan et al., 2000). Im Gegensatz dazu versteht man unter Nekrose den durch äußere Einwirkungen „gewaltsam herbeigeführten Zell-Mord“ (Stephan et al., 2000). Die Auslöser können physikalischer oder chemischer Natur sein, wie Verbrennung, Vergiftung oder mechanische Beschädigung. Diese führen in ausgedehnten Gewebsarealen zu einem Zelltod (Gorman et al., 1996; Choi 1996).

1.1.1 Apoptose

Der apoptotische Zelltod ist durch definierte morphologische Veränderungen der Zellen charakterisiert (Kerr et al., 1972). Die morphologischen Veränderungen des apoptotischen Zelltods sind vielfältig: Schrumpfung der Zellen, Bläschenbildung der Membran, Kondensation des Chromatins, Fragmentation des Zellkerns und Zerfall der Zelle in vesikuläre Strukturen, so genannte apoptotische Körper (Duvall und Wyllie 1986; Kiechle und Zhang, 1998) (Abb.1).

Weiterhin ist der apoptotische Zelltod durch biochemische Veränderungen gekennzeichnet. Während der Apoptose kommt es beispielsweise zu einer Translokation von Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran (van den Eijnde et al., 1998; van Engeland et al., 1998). Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der Plasmamembran und unter nicht pathologischen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Seite der Doppelmembran lokalisiert. Ein weiteres biochemisches Merkmal des apoptotischen Zelltods ist die Aktivierung von Endonukleasen (Bredesen 1995; Walker und Sirkorska, 1997). Diese Endonukleasen spalten den DNA-Doppelstrang an den Verbindungsstücken zwischen den Nukleosomen, was eine Fragmentation der DNA zur Folge hat (Nicotera und Leist, 1997; Walker und Sirkorska, 1997).

Der apoptotische Zelltod tritt vor allem unter physiologischen Bedingungen, wie in der Entwicklung eines Organismus, auf (Oppenheim, 1997). Dieser entwicklungsbedingte apoptotische Zelltod, der eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und des Immunsystems spielt, wird auch programmierter Zelltod genannt (Burek und Oppenheim, 1996; Weller et al., 1997). Zusätzlich kann Apoptose auch unter pathologischen Bedingungen, wie Ischämie und AIDS, auftreten (Gorman et al., 1996; Choi 1996).

1.1.2 Nekrose

Der nekrotische Zelltod ist durch andere morphologische Veränderungen der Zelle charakterisiert und kann dadurch gut von dem apoptotischen Zelltod unterschieden werden (Abb.1). Durch die Schädigung der Plasmamembran nekrotischer Zellen strömt Wasser in die Zelle ein (Duvall und Wyllie 1986). Die Zelle schwillt an und lysiert letztendlich (Duvall und Wyllie 1986). Durch die Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen verursacht ein nekrotischer Zelltod eine entzündliche Reaktion im Gewebe (Savill 1997).

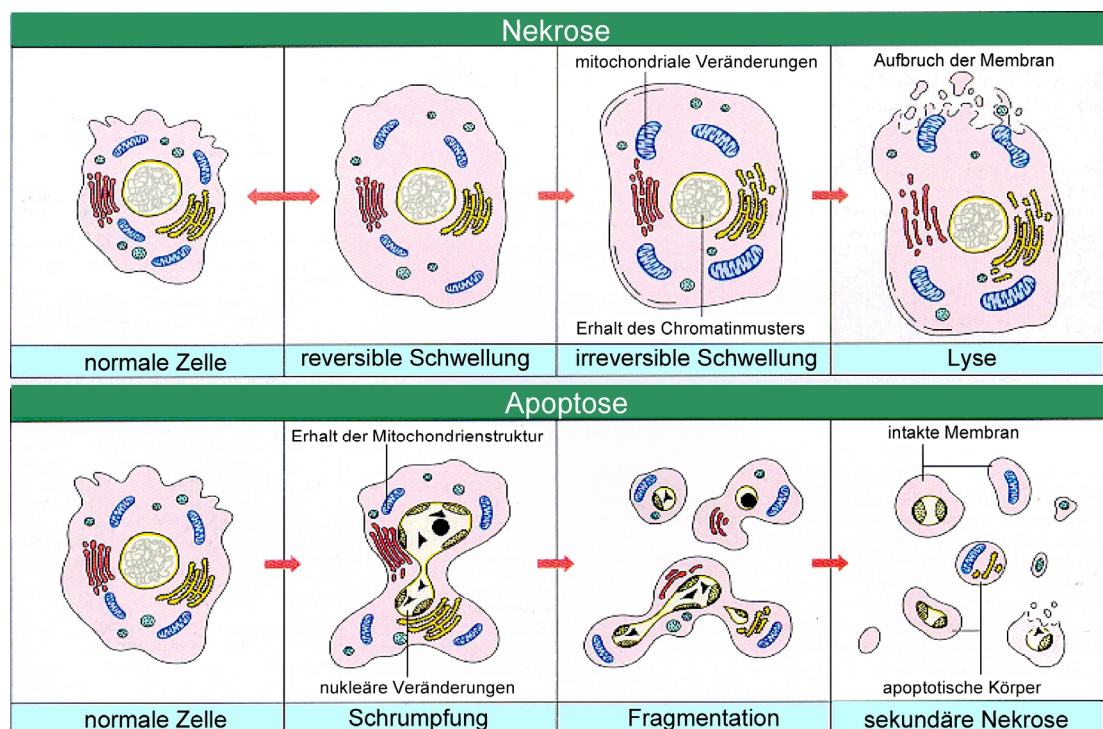


Abbildung 1: Morphologische Merkmale des apoptotischen und nekrotischen Zelltods.

(aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keesey, 1995)

Obwohl Apoptose und Nekrose als zwei unterschiedliche Formen des Zelltods betrachtet werden, gibt es Hinweise, daß Apoptose und Nekrose nur zwei einer Reihe von möglichen morphologisch und biochemisch unterscheidbaren Formen des Zelltods sind (Ankarcrona et al., 1995; Leist und Nicotera, 1997). Ein nekrotischer Zelltod kann beispielsweise einem apoptotischen Zelltod folgen (sekundäre Nekrose), wenn die apoptotischen Zellen nicht durch Phagozyten aufgenommen werden (Leist et al., 1995; Leist und Nicotera, 1997). Der apoptotische und der nekrotische Zelltod können *in vivo* durch die Auswirkungen des Zelltods auf das umliegende Gewebe unterschieden werden. Im Gegensatz zu den Folgen einer Nekrose löst eine Apoptose, aufgrund einer raschen phagozytotischen Entfernung apoptotischer Zellen aus dem Gewebe, keine inflammatorische Antwort aus (Savill et al., 1993; Leist und Nicotera, 1997).

1.2 Apoptose im Nervensystem

Während der Entwicklung des Nervensystems sterben Astrozyten und zwischen 40 und 85 Prozent aller gebildeten Neurone und Oligodendrozyten (Barres und Raff, 1994; Krueger et al., 1995; Burek und Oppenheim, 1996; Oppenheim, 1997; Ludwin 1997). Da Neurone und Oligodendrozyten im Überschuß produziert werden, ist der programmierte Zelltod ein fundamentales und essentielles Merkmal der Entwicklung des Nervensystems (Burek und Oppenheim, 1996). Durch den kontrollierten apoptotischen Zelltod kommt es zur Anpassung der Zahl von Neuronen und Oligodendrozyten an die Anzahl der zu innervierenden Neurone und Zellen des Zielgewebes und zu einer Entfernung fehlerhaft gebildeter neuronaler Verbindungen (Waters 1996). Daher ermöglicht der programmierte Zelltod eine sinnvolle neuronale Netzwerkbildung.

Während der Entwicklung des Nervensystems kann der programmierte Zelltod von Neuronen durch eine Reihe von Faktoren verhindert werden. Die Neurone benötigen beispielsweise zum Überleben trophische Faktoren, die lokal vom Zielgewebe produziert werden (Dragunow et al., 1998). Zu diesen trophischen Faktoren gehören NGF („nerve growth factor“), NT-3 („neurotrophin 3“), BDNF („brain derived neurotrophic factor“) und NT-4/5 („neurotrophin 4/5“) (Johnson et al., 1980; Henderson et al., 1993; Narayanan 1997). Diese Wachstumsfaktoren binden an Rezeptor Tyrosinkinasen und verhindern dadurch eine endogene Kaskade der Selbstzerstörung (Segal et al., 1997; Dragunow et al., 1998).

Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch das Zielgewebe ist ein wichtiger, aber nicht der einzige Mechanismus, durch den das Überleben der Neurone gesteuert werden kann. Afferente Signale von innervierenden Neuronen sind ebenfalls für das Überleben vieler Neurone wichtig (Raff et al., 1993; Burek und Oppenheim, 1996; Pettmann und Henderson, 1998). Die Entfernung von afferenten Neuronen oder die Blockierung der afferenten Aktivität führt daher zu einem erhöhten programmierten neuronalen Zelltod (Okado und Oppenheim, 1984; Kelley et al., 1997; Pettmann und Henderson, 1998). Die Depolarisierung durch diese innervierenden Neurone ist zum Überleben der Neurone wichtig. In Übereinstimmung mit diesem überlebensfördernden, depolarisierenden Effekt *in vivo*, sind einige Neurone, wie die Körnerzellen des Kleinhirns, in Zellkultur auf hohe depolarisierende Kaliumkonzentrationen im Medium angewiesen (Chang und Wang, 1997). Die Depolarisation könnte zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Neurone gegenüber trophischen Faktoren oder zu einer erhöhten endogenen Synthese dieser Faktoren durch die Neurone führen (Ghosh et al., 1994; Meyer et al., 1995; Burek und Oppenheim, 1996; Weller et al., 1997; Pettmann und Henderson, 1998). Zusätzlich sind für das Überleben der Neurone auch Hormone, wie Steroidhormone und von Gliazellen produzierte Faktoren, wie GDNF („glial cell line-derived neurotrophic factor“), entscheidend (Sloviter et al., 1993; Burek und Oppenheim, 1996). GDNF ermöglicht beispielsweise das Überleben von Motoneuronen (Pettmann und Henderson, 1998; Boonman und Isacson, 1999).

Nicht nur die Neurone, sondern auch die Gliazellen sind während der Entwicklung des Nervensystems von einem apoptotischen Zelltod betroffen (Barres und Raff, 1994; Krueger et al., 1995; Narayanan 1997). Das Überleben myelinisierender Gliazellen, wie das der Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Schwannzellen im peripheren Nervensystem (PNS), hängt von trophischen Faktoren ab (Narayanan 1997). Hierbei handelt es sich um bislang unbekannte trophische Faktoren, die auf den Axonen der Neurone exprimiert werden (Frost et al., 1999). Als Folge wird die Anzahl der myelinisierenden Gliazellen der Zahl der noch zu myelinisierenden Axone angepaßt (Burek und Oppenheim, 1996; Frost et al., 1999).

Neuronale und gliale Apoptosen spielen weiterhin eine Rolle bei einer Reihe klinisch bedeutender neurologischer Erkrankungen, wie Schlaganfall, Trauma und neurodegenerativen Erkrankungen (Li et al., 1995; Choi 1996; Agid et al., 1996; Gorman et al., 1996; Bancher et al., 1997; Bonetti et al., 1997; Dragunow et al., 1998; Nicotera und

Lipton, 1999). So weisen Studien in humanem pathologischen Gewebe, transgenen Tiermodellen und *in vitro* Modellen darauf hin, daß die Neurone sowohl in der Alzheimererkrankung als auch in der Parkinsonerkrankung einen apoptotischen Zelltod sterben (Agid et al., 1996; Waters 1996; Kusiak et al., 1996; Drache et al., 1997; Ludwin 1997; Stefanis et al., 1997). Unter pathologischen Situationen, wie Hypoxie und Hypoglykämie tritt ein apoptotischer neuronaler Zelltod aufgrund einer ständigen und/oder starken Aktivierung von Glutamatrezeptoren, wie dem N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDA-Rezeptor), auf (Choi 1988; Coyle und Puttfarcken, 1993; Leist und Nicotera, 1998). Diese Aktivierung der Glutamatrezeptoren wird auf eine erhöhte Ausschüttung von Glutamat und/oder fehlende Aufnahme des Glutamats aus dem synaptischen Spalt zurückgeführt (Meldrum und Garthwaite, 1990; Leist und Nicotera, 1998). Der NMDA Rezeptor ist ein ligandenabhängiger Kationenkanal, der neben Natrium- und Kalium- auch für Kalziumionen durchlässig ist. Eine langanhaltende und/oder starke Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt folglich zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Bonfoco et al., 1996). Die erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle aktiviert Enzyme wie Proteasen, Phospholipasen und die Kalzium-Calmodulin abhängige Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) (Choi 1988; Manev et al., 1989; Leist und Nicotera, 1998). Die Aktivierung dieser Enzyme kann einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod zur Folge haben (Ankarcrona et al., 1995; Nicotera et al., 1997a; Leist et al., 1997). Der nekrotische Zelltod von Neuronen, mit seiner unkontrollierten Ausschüttung von intrazellulären Substanzen wie Glutamat, führt wiederum zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf benachbarten Neuronen (Nicotera und Leist, 1997).

Die apoptotischen Zellen im Nervensystem werden sowohl während der Entwicklung als auch unter pathologischen Bedingungen phagozytiert und dadurch aus dem Gewebe entfernt (Waters 1996). Da Mikrogliazellen die professionellen Phagozyten im zentralen Nervensystem sind, übernehmen sie hauptsächlich die Funktion der Entfernung apoptotischer Zellen aus dem Gewebe und verhindern dadurch die Auslösung einer inflammatorischen Antwort.

1.3 Mikroglia

Das zentrale Nervensystem (ZNS) gehört zu den immunologisch abgegrenzten Regionen im Körper (Lassmann 1997). Immunzellen, Antikörper und andere immunologische Moleküle können die intakte Bluthirnschranke des Gehirns kaum überwinden (Hickey et al., 1991; Lassmann 1997). Lediglich wenige Monozyten und aktivierte T-Lymphozyten können im ZNS nachgewiesen werden (Lassmann 1997). Aktivierte T-Lymphozyten können die Bluthirnschranke überwinden, jedoch ist bisher unklar, wie Monozyten ins Gehirn einwandern (Hickey et al., 1991; Wekerle 1995; Lassmann 1997). Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression von immun relevanten Oberflächenmolekülen im ZNS, wie den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klassen, kaum nachweisbar (Hart und Fabry, 1995; Lassmann 1997). Aus diesem Grund können aktivierte T-Lymphozyten ihr spezifisches Antigen nicht erkennen und somit auch nicht wirksam werden (Hart und Fabry, 1995; Lassmann 1997). Unter pathologischen Bedingungen, wie Ischämie, nimmt die Expression von immun relevanten Zelloberflächenmolekülen, wie den MHC-Klasse 1 und 2 Molekülen, vor allem auf Mikrogliazellen zu (Kato et al., 1995; Kreutzberg 1996). Mikrogliazellen fungieren dann als antigenrepräsentierende Zellen, indem sie durch ein Antigen in Verbindung mit einem MHC Klasse 2 Molekül einen T-Lymphozyten aktivieren (Matsumoto et al., 1992; Wekerle 1995; Zielasek und Hartung, 1996). Daher werden Mikrogliazellen als die Immuneffektorzellen des ZNS ansehen.

Die ontogenetische Herkunft der Mikrogliazellen ist noch umstritten (Fedoroff 1995). Aufgrund von *in vitro* Studien, in denen sich Mikrogliazellen aus kultivierten Zellen des embryonalen Neuralrohrs entwickelten, wurde die Ansicht vertreten, daß Mikrogliazellen, wie alle anderen Gliazellen des zentralen Nervensystems neuroektodermalen Ursprung sind (Hao et al., 1991; Richardson et al., 1993). Die meisten Evidenzen sprechen jedoch dafür, daß sich die Mikrogliazellen, im Gegensatz zu allen anderen Zelltypen des ZNS, ontogenetisch von den Monozyten herleiten lassen (Hickey et al., 1992; Ling und Wong, 1993). Monozyten wandern während der frühen embryonalen Entwicklung an bevorzugten Stellen, den 'hot-spots', ins Gehirn ein (Ling und Wong, 1993). In diesem Stadium besitzen die Monozyten/Mikroglia eine runde Morphologie mit wenigen Ausläufern. Während der weiteren Entwicklung des ZNS differenzieren die Mikrogliazellen zu Zellen mit kleinem Zellkörper und vielen langen, verzweigten Ausläufern aus (Streit und Kincaid Colton, 1995). Die Mikroglia sind während der Entwicklung des ZNS an der Phagozytose

apoptotischer Neurone und Gliazellen beteiligt und ermöglichen durch Sekretion von trophischen Faktoren, wie Plasminogen, NGF („nerv growth factor“) und NT-3 („neurotrophin-3“), das Überleben von Neuronen (Ashwell, 1990; Perry und Gordon, 1991; Streit und Kincaid Colton, 1995; Zielasek und Hartung, 1996; Elkabes et al., 1996; Aschner et al., 1999). Im adulten Gehirn sind die Mikrogliazellen gleichmäßig über alle Gehirnregionen verteilt und weisen eine verzweigte Morphologie auf, die als ramifiziert bezeichnet wird (Perry und Gordon, 1991; Kreutzberg 1996). Jede einzelne ramifizierte Mikrogliazelle deckt ein bestimmtes Areal mit ihren Ausläufern im Gewebe ab, ohne daß sich die Areale verschiedener Mikrogliazellen überschneiden (Lawson et al., 1990; Streit und Kincaid Colton, 1995). Die ramifizierte Mikroglia weist eine geringe Expression von immunrelevanten Molekülen, wie z.B. MHC, auf und wird daher als immunologisch „ruhend“ bezeichnet (Wu et al., 1994; Kreutzberg 1996). Durch die ramifizierte Morphologie haben die Mikrogliazellen engen Kontakt zu vielen Zellen in ihrer Umgebung (Streit und Kincaid Colton, 1995). Aus diesem Grund können Veränderungen in der Umgebung der Mikrogliazelle wahrscheinlich schnell registriert werden und zu einer Reaktion der Mikroglia führen.

Unter pathologischen Bedingungen, wie bei bakteriellen und viralen Infektionen des Nervensystems, neurodegenerativen und demyelinisierenden Erkrankungen, Trauma und Ischämie wird die ruhende Mikroglia aktiviert (zur Übersicht: Zielasek und Hartung, 1996). Diese Aktivierung ist mit einer morphologischen Veränderung der Zelle verbunden (Kreutzberg 1996). Es kommt zu einer Reduzierung der Ausläufer und zu einer Vergrößerung des Zellkörpers (Kreutzberg 1996). Neben diesen morphologischen Veränderungen wird der Aktivierungsprozess von einer Proliferation und von einer Migration der Mikroglia zum Ort des pathologischen Ereignisses begleitet (Kreutzberg 1996). In geschädigten Bereichen des Gehirns, wie bei den vom β -Amyloid Peptid gebildeten Plaques in der Alzheimer Krankheit, kann daher eine erhöhte Ansammlung von aktivierten Mikrogliazellen festgestellt werden (McGeer und McGeer, 1998). Kommt es durch den pathologischen Vorgang zum Absterben von Zellen, wird die Mikrogliazelle phagozytotisch aktiv (Streit 1995; Kreutzberg 1996).

Während der Aktivierung der Mikrogliazellen kommt es zu einer neuen bzw. verstärkten Expression von Zelloberflächenmolekülen (Graeber et al., 1988; Raivich et al., 1991; Zielasek und Hartung, 1996). Zu diesen Molekülen gehören die MHC Klassen, die Rezeptoren für den Komplementfaktor 3a (CR3), die Fc-Rezeptoren zur Erkennung von

Antikörpern und die Rezeptoren für GM-CSF (Granulozyt-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor) (Graeber et al., 1988; Raivich et al., 1991; Zielasek und Hartung, 1996). GM-CSF und M-CSF werden von Astrozyten und Fibroblasten produziert und regen die Proliferation der Mikroglia an (Benveniste 1995).

Eine Aktivierung der Rezeptoren durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) oder durch Komplementfaktoren (C3a, C5a) ist mit einem intrazellulären Kalziumsignal und einer Aktivierung von Kaliumkanälen in der Mikrogliazelle verbunden (Walz et al., 1993; Ilshner et al., 1995; Ilshner et al., 1996; Moller et al., 1997). Kaliumkanäle mit auswärtsgleichrichtenden Eigenschaften treten im Gegensatz zu unstimulierten kultivierten Mikrogliazellen in aktivierten, kultivierten Mikrogliazellen auf (Eder 1998). Daher wird die Expression von Kaliumkanälen mit auswärtsgleichrichtenden Eigenschaften als ein Aktivierungsmarker für Mikrogliazellen angesehen.

Die aktivierte Mikroglia sekretiert zudem Zytokine, wie „tumor-necrosis factor alpha“ (TNF α), „transforming growth factor beta“ (TGF β 1) und Interleukine (z.B. IL-1 und IL-6) (Lee et al., 1993; Zielasek und Hartung, 1996; Prinz et al., 1999). Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Induzierung bzw. Modulation des inflammatorischen Prozesses. Auch Chemokine, die chemoattraktiv auf inflammatorische Zellen wirken und zum verstärkten Einwandern von Leukozyten führen, werden von der aktivierten Mikroglia produziert (Prinz et al., 1999; Bacon und Harrison, 2000). Ferner kommt es zur Sekretion von adhäsiven Glykoproteinen wie Thrombospondin, welches eine Bedeutung für die Erkennung von apoptotischen Zellen besitzen könnte (Kreutzberg 1996; Moller et al., 1996) (siehe 1.4.1.3).

Eine Aktivierung der Mikrogliazelle führt neben der Induktion einer immunologischen Antwort, einer Phagozytose und einer Unterstützung des Regenerationsvorgangs ab einem bestimmten Grad der Aktivierung auch zur Schädigung des umliegenden Gewebes (Streit und Kincaid Colton, 1995). Aktivierte Mikrogliazellen sekretieren zytotoxische Substanzen wie freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO), Proteasen, Glutamat und zytotoxische Zytokine, wie TNF- α (Banati et al., 1993; Streit und Kincaid Colton, 1995; Kreutzberg 1996; Aschner et al., 1999). Diese zytotoxischen Substanzen schädigen neben fremden Pathogenen oder letal verletzten Neuronen auch intakte Zellen (Streit und Kincaid Colton, 1995). Oligodendrozyten sind besonders empfindlich gegenüber diesen

zytotoxischen Substanzen, aber auch Neurone werden durch diese Substanzen angegriffen, wodurch es zu einer Auslösung des Zelltods in diesen Zellen kommt (Selmaj et al., 1991; Downen et al., 1999).

1.4 Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten

Im lebenden Organismus kommt es innerhalb kurzer Zeit (1-2 Stunden) zu einer Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Phagozyten (Savill 1997). Aufgrund der effizienten Phagozytose können nur wenige apoptotische Zellen im Gewebe nachgewiesen werden. Trotzdem kann der Zellverlust durch die entwicklungsbedingte oder pathologische Apoptose im Gewebe dramatisch sein. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung der Apoptose für den Organismus erst spät erkannt. An der Aufnahme apoptotischer Zellen sind nicht nur professionelle Phagozyten, wie Makrophagen und Mikrogliazellen sondern auch „semiprofessionelle“ Phagozyten, wie Epithelzellen und Hepatozyten beteiligt (Dini et al., 1992; Savill 1997).

Die Phagozytose von apoptotischen Zellen verhindert eine inflammatorische und immunologische Antwort, was durch histologische Studien über den entwicklungsbedingten Zelltod gezeigt werden konnte (Savill 1997). Obwohl eine große Zahl apoptotischer Zellen während der Entwicklung durch Phagozyten aufgenommen wird, konnte ein inflammatorischer Prozess im Gewebe bisher nicht nachgewiesen werden. Das Ausbleiben einer inflammatorischen und immunologischen Antwort beruht einerseits darauf, daß phagozytierende Zellen durch die Aufnahme apoptotischer Zellen nicht aktiviert werden, sondern vielmehr deaktivierende Faktoren ausschütten (Green und Beere, 2000). Andererseits wird durch die rasche Entfernung eine sekundäre Nekrose der apoptotischen Zellen vermieden (Savill 1997).

Die Lyse apoptotischer Zellen (sekundäre Nekrose), und die damit einhergehende Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen hat eine inflammatorische Antwort zur Folge (Savill 1997). Eine unvollständige Phagozytose apoptotischer Zellen aufgrund eines induzierten massiven apoptotischen Zelltods von Hepatozyten in Mäusen ist daher wahrscheinlich ursächlich für den Tod der Tiere verantwortlich (Ogasawara et al., 1993; Savill 1997; Ren und Savill, 1998). Protein- oder DNA-Fragmente aus sekundär nekrotischen Zellen, die aufgrund von Proteolyse intrazellulärer Proteine und Spaltung des Chromatins während der Apoptose entstehen, könnten außerdem zu einer

immunologischen Antwort führen (Ren und Savill, 1998). DNA-Fragmente (Oligonukleosome) aus apoptotischen Zellen können beispielsweise eine Immunglobulinsynthese in Lymphozyten induzieren, was eine immunologische Antwort zur Folge hat (Bell und Morrison, 1991; Savill 1997). Im Blut vieler Autoimmunerkrankter konnten des weiteren Oligonukleosomen, die von apoptotischen Zellen stammen könnten, nachgewiesen werden (Savill 1997).

Durch die Phagozytose von apoptotischen Zellen wird weiterhin die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie „transforming growth factor- β “ (TGF- β) aktiviert und die Produktion von inflammatorischen Molekülen, wie TNF- α inhibiert (Fadok et al., 1998b; Green und Beere, 2000). Diese antiinflammatorische Antwort der Phagozyten beruht auf einem spezifischen Bindungsmechanismus, durch den diese Phagozyten apoptotische Zellen erkennen und aufnehmen (Fadok et al., 1998). Wenn der spezifische Bindungsmechanismus durch eine Opsonierung der apoptotischen Zellen mit Antikörpern verhindert wird, so daß die apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Fc- oder Komplement Rezeptors durch die Makrophagen aufgenommen werden, kommt es zur Auslösung einer inflammatorischen Antwort (Fadok et al., 1998b). Weiterhin kommt es bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen, im Gegensatz zur Phagozytose von nekrotischen Zellen, nicht zu einer Expression von co-stimulierenden Molekülen. Dadurch wird eine T-Zell Aktivierung vermieden (Green und Beere, 2000). Das Fehlen von co-stimulierenden Molekülen führt vielmehr zu einer Toleranz der spezifischen T-Zellen gegenüber den durch das MHC-I präsentierten Peptiden der apoptotischen Zelle (Green und Beere, 2000).

Eine effiziente Beseitigung apoptotischer Zellen verhindert daher die Inflammation des Gewebes und die Auslösung einer (auto)Immunantwort auf potentielle (selbst)Antigene von apoptotischen Zellen.

1.4.1 Erkennungsmechanismen

Während für das periphere Immunsystem ein breites Verständnis über die Mechanismen vorliegt, die zur Aufnahme von apoptotischen Zellen führen, ist das Wissen darüber für das ZNS noch gering (Savill et al., 1993). In diesem Kapitel werden überwiegend Erkennungsmechanismen zwischen apoptotischen Zellen und Makrophagen bzw. Monozyten aus dem peripheren Immunsystem beschrieben (Abb. 2).

Eine Grundvoraussetzung für die Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten ist eine veränderte Oberflächenstruktur der apoptotischen Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen (Savill et al., 1993). Da eine Neusynthese von Proteinen kein generelles Merkmal der Apoptose ist, ist eine Markierung apoptotischer Zellen durch ein neu synthetisiertes spezifisches Zelloberflächenprotein unwahrscheinlich (Savill et al., 1993). Nach dem heutigen Verständnis beruht die Erkennung von apoptotischen Zellen auf eine Veränderung bereits existierender Plasmamembranbestandteile (Savill et al., 1993) (Abb.2).

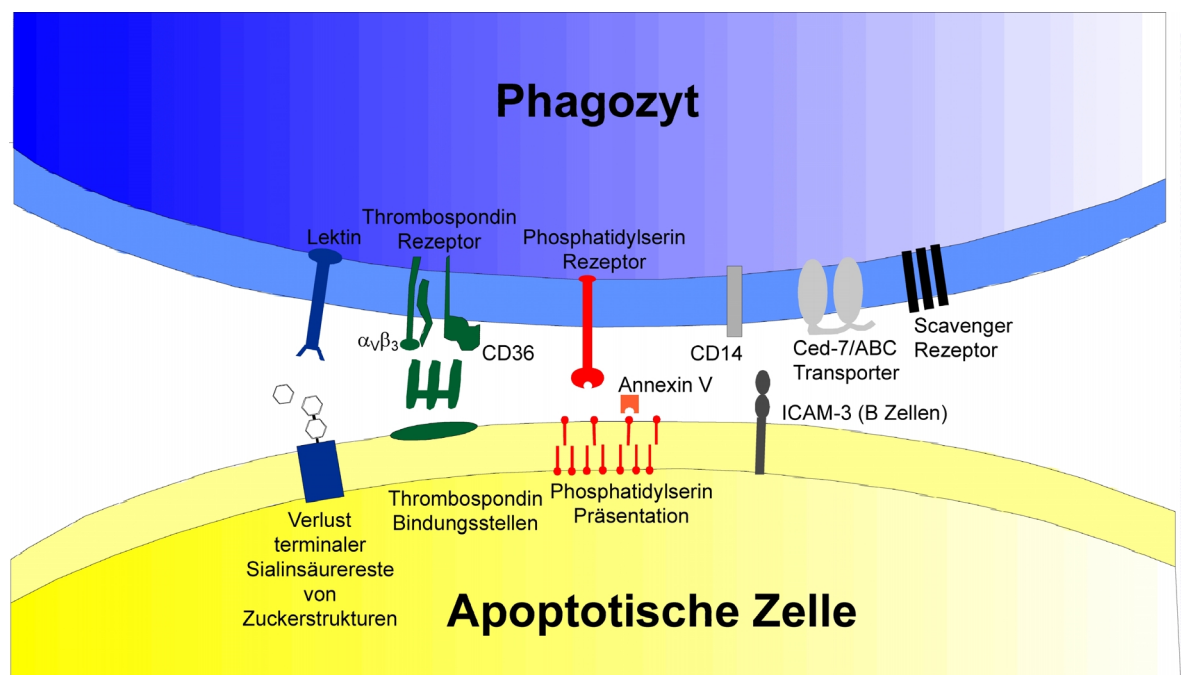


Abbildung 2: Verschiedene Erkennungsmechanismen, die zur Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Phagozyten führen können.

1.4.1.1 Erkennung spezifischer Zuckerstrukturen

Während des apoptotischen Prozesses kommt es zu Veränderungen der Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen (Dini et al., 1992). Durch den Verlust terminaler Sialinsäurereste von Zuckerstrukturen der Glykoproteine auf der Oberfläche apoptotischer Zellen werden Reste wie N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und Galaktose exponiert (Duvall et al., 1985; siehe Abb.2). Lektine, die selektiv N-Acetylgalaktosamin erkennen, konnten daher apoptotische Leberzellen der Ratte markieren (Dini et al., 1992). Die exponierten Zuckerreste auf apoptotischen Zellen können durch Lektine der Phagozyten erkannt werden (Duvall et al., 1985; Savill et al., 1993; Falasca et al., 1996; siehe Abb.2). Die Erkennung apoptotischer Thymozyten durch Peritonealmakrophagen kann daher durch Mono- und Disaccharide inhibiert werden, die an die Lektine der Phagozyten binden (Duvall et al., 1985).

Die Exposition der veränderten Zuckerstrukturen ist wahrscheinlich eine Folge von späten Ereignissen des apoptotischen Prozesses, da es in den späten Phasen der Apoptose zu einer Fusion der Plasmamembran mit Elementen des Endoplasmatischen Retikulums und/oder des Golgi-Apparats kommt (Savill 1997). Diese Organellen enthalten Proteine, die sich noch im Prozess der Glykolisierung befinden und daher Zucker wie N-Acetylglukosamin exponieren (Duvall et al., 1985). Die Erkennung apoptotischer Zellen durch Lektine scheint bei semiprofessionellen Phagozyten, wie Fibroblasten, Epithelzellen und Hepatozyten von Bedeutung zu sein (Dini et al., 1992). Bei diesen Zellen konnte die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Monosaccharide inhibiert werden (Dini et al., 1992; Savill 1997). Hepatozyten können veränderte Zuckerstrukturen durch einen Asialoglykoproteinrezeptor erkennen (Dini et al., 1992). Andere Lektine der Phagozyten, die veränderte Zuckerstrukturen apoptotischer Zellen erkennen, sind bisher nicht bekannt (Savill 1997). Da eine Erkennung apoptotischer Zellen schon in frühen Phasen des apoptotischen Prozesses erfolgt sollten professionelle Phagozyten weitere Rezeptoren für die Erkennung apoptotischer Zellen exprimieren (Savill 1997).

1.4.1.2 Erkennung von Phosphatidylserin

Unter physiologischen Bedingungen zeichnet sich die Plasmamembran von Zellen durch eine Phospholipidasymmetrie aus. Auf der Außenseite der Plasmamembran befinden sich überwiegend Lipidmoleküle, die Cholin in der Kopfgruppe enthalten, wie Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin. Aminophospholipide, wie Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) befinden sich dagegen überwiegend auf der Innenseite der Plasmamembran. Diese Plasmamembranasymmetrie wird durch eine ATP-abhängige Aminophospholipid Translokase aufrecht erhalten, die PS und PE auf die zytosolische Seite der Plasmamembran transportiert (Zwaal und Schroit, 1997). Während des apoptotischen Prozesses einer Zelle kommt es zur Präsentation von PS auf der Außenseite der Plasmamembran (van den Eijnde et al., 1998; van Engeland et al., 1998; siehe Abb.2). Ursache dafür sind die Inhibierung der Aminophospholipid Translokase und die Aktivierung einer kalziumabhängigen Lipid-Scramblase, die Phospholipide zwischen den zwei Membranseiten transportiert (flip-flop) (Zwaal und Schroit, 1997; Fadok et al., 1998). Dies führt innerhalb von Minuten zu einem Verlust der Phospholipidasymmetrie und damit zu einer Präsentation des anionischen PS auf die Außenseite der Plasmamembran (Zwaal und Schroit, 1997; Fadok et al., 1998). Untersuchungen mit PS bindendem Annexin-V zeigten, daß die Präsentation von PS ein sehr früher Marker der Apoptose ist (Martin et al., 1995; Vincent und Maiese, 1999). Die Präsentation von PS tritt bereits vor den charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose und vor der nukleären Kondensation auf (Martin et al., 1995; van Engeland et al., 1998).

Fadok und Mitarbeiter brachten den Verlust der Phospholipidasymmetrie der Plasmamembran und die damit einhergehende Präsentation von PS mit der Erkennung von apoptotischen Zellen durch Phagozyten in Zusammenhang (Fadok et al., 1992; Savill et al., 1993; Platt et al., 1996). Liposome, die PS enthielten, oder wasserlösliche PS Analoga inhibierten kompetitiv die Erkennung apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen (Fadok et al., 1992). Da einige Phagozyten PS exprimierende Zellen binden, ohne sie zu phagozytieren, scheint die Phagozytose noch von weiteren Faktoren abzuhängen (Schwartz et al., 1985; Savill 1997).

Mögliche Rezeptoren für PS könnten Scavenger-Rezeptoren auf den Phagozyten sein (Fadok et al., 1998; Platt et al., 1996). Der Ausdruck „Scavenger Rezeptor“ wurde eingeführt, um Bindungsstellen für chemisch modifizierte Formen (acetylierte oder

oxidierte Form) von Lipoproteinen mit niedriger Dichte („low density lipoprotein“ (LDL)) auf der Oberfläche von Makrophagen zu beschreiben (Hart et al., 1996). Die Scavenger Rezeptoren werden in sechs Gruppen unterteilt und stellen eine Familie von strukturell unterschiedlichen Rezeptoren mit einer breiten Ligandenspezifität dar (Platt et al., 1998). Die Klassen B und D Scavenger Rezeptoren binden PS-Liposome (Fadok et al., 1998). Zu den Klasse B Scavenger Rezeptoren gehört CD36, welches auch Thrombospondin bindet (Rigotti et al., 1995; Aderem und Underhill, 1999; siehe Abb.2). Obwohl CD36 an PS bindet, konnte nicht gezeigt werden, daß diese Bindung zu einer Aufnahme von apoptotischen Zellen führt (Fadok et al., 1998). Dagegen wird die PS-Bindung durch den Klasse D Scavenger Rezeptor CD68 (Mensch) oder Macrosialin (Maus) für eine Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Peritonealmakrophagen benötigt. Dies konnte durch Experimente mit einem Antikörper gegen CD68 und Liposomen, die PS enthielten, gezeigt werden (Sambrano und Steinberg, 1995; Fadok et al., 1998). Für die Scavenger Rezeptoren der Klasse A (SR-As) konnte bisher keine Bindung an PS beobachtet werden (Fadok et al., 1998). Die SR-As sind jedoch an der Phagozytose von apoptotischen Zellen beteiligt, wie *in vitro* Studien an der Phagozytose apoptotischer Thymozyten durch Makrophagen zeigten (Hart et al., 1996; siehe Abb.2). Diese Phagozytose konnte durch monoklonale Antikörper gegen SR-As inhibiert werden (Hart et al., 1996). *In vitro* wurde die Phagozytose von apoptotischen Thymozyten durch Makrophagen aus einer SR-A Null Maus, die keine SR-As exprimierten, um 50% reduziert (Platt et al., 1996; Terpstra et al., 1997). *In vivo* nahm die relative Anzahl von apoptotischen Thymozyten in den SR-A Null Tieren jedoch nicht zu, was darauf hindeutet, daß andere Rezeptoren ebenfalls eine Rolle für die Entfernung von apoptotischen Zellen im Thymus spielen (Fadok et al., 1998).

Neben den Scavenger Rezeptoren könnte das CD14 Molekül, das für die Vermittlung von LPS-Signalen bekannt ist, PS auf apoptotischen Zellen binden (Devitt et al., 1998). Die Bedeutung des CD14 für die Phagozytose von apoptotischen Zellen wurde durch Experimente mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD14 gezeigt, der spezifisch die Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durch Makrophagen verhinderte (Devitt et al., 1998; siehe Abb.2). Die apoptotischen Zellen binden an oder in der Nähe der LPS-Bindungsstelle (Devitt et al., 1998). Trotzdem wird durch die Bindung apoptotischen Zellen an CD14, im Gegensatz zur Bindung von LPS, keine inflammatorische Antwort ausgelöst (Devitt et al., 1998).

Weiterhin könnten das Serumprotein β 2-Glykoprotein-I, welches an anionische Phospholipide bindet, und das lösliche GAS-6 Protein, das an Tyrosinkinaserzeptoren bindet und die kalziumabhängige Bindung von U937 Zellen an PS-beschichteten ELISA Platten vermittelt, an der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Phagozyten beteiligt sein (Nakano et al., 1997; Balasubramanian et al., 1997; Fadok et al., 1998). In der Gegenwart von β 2-Glycoprotein konnten Antiphospholipid-Antikörper aus Patienten mit dem Antiphospholipid Antikörper Syndrom (aPL) apoptotische Zellen opsonieren (Price et al., 1996).

Erst kürzlich wurde ein Antikörper (217) generiert, der im gleichen Ausmaß wie PS-Liposome die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen inhibiert (Fadok et al., 2000). Dieser Antikörper bindet an ein bisher unbekanntes Oberflächenprotein auf der Oberfläche von Makrophagen und Epithelzellen (Fadok et al., 2000).

1.4.1.3 Thrombospondin-vermittelte Erkennung

Apoptotische Zellen besitzen anionische Thrombospondin-1 Bindungsstellen auf der Zelloberfläche (Savill et al., 1993; siehe Abb.2). Diese Bindungsstellen ermöglichen apoptotischen Neutrophilen *in vitro* die Bindung von Latexkugeln, die mit dem Protein Thrombospondin-1 (TSP1) beschichtet sind (Savill et al., 1992). TSP1 ist ein trimeres, multifunktionales, adhäsives Glykoprotein, welches von Makrophagen und Mikroglia sekretiert und von diesen auch erkannt werden kann (Savill et al., 1990; Kreutzberg 1996; Savill 1997). Die Erkennung von apoptotischen Zellen kann daher mit Hilfe von TSP1, das die apoptotische Zelle mit dem Phagozyten verbindet, erfolgen (Savill 1997). Die Erkennung apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen kann spezifisch durch kationische Aminosäuren, die die anionischen TSP1 Bindungsstellen auf den apoptotischen Zellen maskieren, inhibiert werden (Savill et al., 1993).

TSP1 besitzt die spezifische Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin (RGD), die durch Integrine von Makrophagen gebunden werden kann (Savill et al., 1990). Für die TSP1 vermittelte Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen ist ein TSP Rezeptor von Bedeutung, der sich aus dem CD36 und dem Vitronektin Rezeptor (Integrin $\alpha_v\beta_3$) zusammensetzt (Savill et al., 1990; Savill et al., 1992; Ren et al., 1995; siehe Abb.2). Die Erkennung von apoptotischen Eosinophilen und Lymphozyten durch Makrophagen

kann daher durch Antikörper gegen TSP1, gegen das CD36 oder gegen den Vitronektin Rezeptor und durch RGD Peptide, die an den Vitronektin Rezeptor binden, spezifisch inhibiert werden (Savill et al., 1992). Semiprofessionelle glomeruläre Zellen der Niere, die CD36 nicht exprimieren, besitzen ebenfalls einen TSP1 vermittelten Mechanismus zur Erkennung von apoptotischen Zellen (Hughes et al., 1997). Dieser TSP1 vermittelte Mechanismus in dem der Vitronektin Rezeptor involviert ist, ist in Bezug auf die Zahl der phagozytierten Zellen dreimal weniger effizient als der Vitronektin/TSP1/CD36-Mechanismus von Makrophagen (Savill 1997; Hughes et al., 1997). Daher wird vermutet, daß das CD36 eine verstärkende Rolle bei der Vitronektin/TSP-vermittelten Erkennung einnimmt (Savill 1997). Dieser verstärkende Effekt bei der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch CD36 könnte auf der Fähigkeit des CD36-Moleküls beruhen, oxidierte Oberflächenreste auf apoptotischen Zellen zu erkennen und zu binden (Endemann et al., 1993; Savill 1997). Jedoch ist eine PS Erkennung auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen mittels CD36 nicht für den verstärkenden Effekt bei der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Makrophagen verantwortlich, da PS Inhibitoren den verstärkenden Effekt von CD36 auf die Phagozytose nicht inhibieren konnten (Fadok et al., 1992; Ren et al., 1995; Savill 1997). Eine Vitronektin Erkennung von apoptotischen Zellen spielt auch bei dendritischen Zellen, die ebenfalls kein CD36 exprimieren, eine Rolle (Rubartelli et al., 1997). Diese Phagozytose von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen ist im Gegensatz zu der Phagozytose durch Makrophagen mit einem intrazellulären Kalziumsignal verbunden (Rubartelli et al., 1997). Dieses Kalziumsignal wird sowohl durch Kalzium aus den intrazellulären Speichern als auch durch extrazelluläres Kalzium generiert und ist für die Aufnahme apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen notwendig, da Kalziumchelatoren diese Aufnahme inhibieren konnten (Rubartelli et al., 1997).

Unklar ist, durch welchen Mechanismus TSP1, welches auch an nicht apoptotische Zellen binden kann, apoptotische Zellen für eine Phagozytose markiert (Savill 1997). Möglicherweise wird TSP1 durch die bislang nicht näher identifizierten TSP1 Bindungsstellen auf apoptotischen Zellen in einer prophagozytischen Konformation präsentiert (Savill 1997).

1.4.1.4 Weitere Erkennungsmechanismen

Antikörper gegen ICAM-3 auf der Oberfläche von apoptotischen B-Zellen inhibierten die Erkennung dieser Zellen durch Phagozyten (Flora und Gregory, 1994; Savill 1997). ICAM-3 könnte daher ein weiterer Marker für die Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten darstellen (siehe Abb.2).

Es gibt Hinweise, daß das Makrophagen ABC-1 („ATP binding cassette-1“) Molekül in Mäusen an der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Peritonealmakrophagen beteiligt ist (Luciani und Chimini, 1996; Devitt et al., 1998; siehe Abb.2). Dieses Molekül ist ein Mitglied der ABC Superfamilie von Membrantransportern. Antikörper gegen die zytoplasmatische ATP-Bindungsdomäne des transmembranen ABC-1 Moleküls inhibierten die Aufnahme von apoptotischen Thymozyten durch Makrophagen (Luciani und Chimini, 1996; Savill 1997). Die ABC Transporter besitzen eine Proteinsequenzhomologie zu dem Ced-7 Protein des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Moynault et al., 1998). In diesem Nematoden wurden sieben Gene identifiziert, die bei der Entfernung von apoptotischen Zellen durch Phagozytose beteiligt sind (Liu und Hengartner, 1999). So führen Mutationen im *ced-7* Gen beispielsweise zu einer verringerten Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Nachbarzellen (Ellis et al., 1991). Das Ced-7 Protein spielt sowohl in der phagozytierenden wie auch in der apoptotischen Zelle eine Rolle (Wu und Horvitz, 1998). Wahrscheinlich ist das Protein daher wichtig für die Interaktion zwischen diesen Zellen (Wu und Horvitz, 1998). Das ABC-1 Molekül könnte eine ähnliche Funktion bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen einnehmen. Es wird diskutiert, daß das ABC-1 Molekül an der Aufrechterhaltung des Lipidgleichgewichts entlang der Plasmamembrandoppelschicht beteiligt ist (Marguet et al., 1999).

Obwohl mehrere Rezeptoren für die Erkennung apoptotischer Zellen auf den Makrophagen vorliegen, sind in den spezifischen Zellsystemen immer bestimmte Rezeptorsysteme vorrangig für die Erkennung von apoptotischen Zellen verantwortlich (Aderem und Underhill, 1999). Welcher Mechanismus zur Erkennung von apoptotischen Zellen führt, hängt vermutlich von der Makrophagenpopulation ab (Fadok et al., 1992). Beispielsweise läßt sich die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Peritonealmakrophagen durch PS inhibieren, während sich die Phagozytose dieser Zellen durch Knochenmarksmakrophagen mit RGDS inhibieren läßt (Fadok et al., 1992). Der bevorzugte Phagozytosemechanismus hängt ebenfalls von der zu phagozytierenden apoptotischen Zelle ab (Aderem und Underhill, 1999). Die Aufnahme apoptotischer Lymphozyten durch Peritonealmakrophagen kann durch PS blockiert werden, während die Aufnahme von apoptotischen Neutrophilen durch dieses Phospholipid nicht gehemmt wird (Hart et al., 1996; Aderem und Underhill, 1999). Außerdem kann das bevorzugte Rezeptorsystem zur Aufnahme von apoptotischen Zellen auch vom Aktivierungszustand der Makrophagenzelle abhängig sein (Ren und Savill, 1995). Die Aufnahme apoptotischer Lymphozyten durch aktivierte Makrophagen erfolgt beispielsweise durch Lektin-ähnliche Rezeptoren, während diese Phagozytose durch unaktivierte Makrophagen mit Hilfe eines TSP vermittelten Mechanismus erfolgt (Pradhan et al., 1997).

2 Zielstellung

Der apoptotische Zelltod spielt im zentralen Nervensystem während der Entwicklung und unter pathologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle (Oppenheim, 1997; Nicotera und Lipton, 1999). Mikrogliazellen stellen die professionellen Phagozyten im ZNS dar und sind maßgeblich an der Entfernung von apoptotischen Zellen aus dem Gewebe beteiligt. Durch die rasche und effiziente Entfernung der apoptotischen Zellen aus dem Gewebe wird ein inflammatorischer Prozess vermieden (Savill 1997). Ein inflammatorischer Prozess hat immer den Zelltod von nicht geschädigten Zellen im Gewebe zur Folge (Leist und Nicotera, 1998). Gerade im ZNS kann ein neuronaler und/oder glialer Zellverlust aufgrund einer eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Gewebes dramatische Folgen haben (Bahr und Bonhoeffer, 1994). Eine erfolgreiche Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Mikrogliazellen ist daher zur Vermeidung eines inflammatorischen Prozesses notwendig. Die Mechanismen, die die Aufnahme von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen ermöglichen, sind jedoch bisher nicht charakterisiert worden.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Erkennungsmechanismen zwischen apoptotischen Zellen des Nervensystems und Mikrogliazellen. Zur Bearbeitung dieser Thematik war die Etablierung einer neuronalen Kultur notwendig, in der ein apoptotischer Zelltod ausgelöst werden konnte. Dazu wurden Körnerzellen des Kleinhirns verwendet, in denen mit Hilfe von Stickstoffmonoxid (NO) eine Apoptose ausgelöst wurde. Die Charakterisierung des durch NO ausgelösten Zelltods in den Körnerzellen des Kleinhirns erfolgte anhand morphologischer und biochemischer Merkmale. Um die Mechanismen zu untersuchen, die zur Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen führen, wurde ein Interaktionsmodell zwischen apoptotischen Kleinhirnnuronen und kultivierten Mikroglia entwickelt. In diesem Interaktionsmodell wurden Inhibitoren, die im peripheren Immunsystem bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine Rolle spielen, auf ihre Wirkung auf die Erkennung von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen hin untersucht.

Aus den durchgeführten Versuchen wurde ersichtlich, daß ein Phosphatidylserinrezeptor (PS-Rezeptor) auf Mikrogliazellen an der Erkennung und Aufnahme apoptotischer Neurone beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden die Bindung von PS durch den PS-Rezeptor auf der Mikrogliazelle und die Verknüpfung des PS-Rezeptors mit möglichen intrazellulären Signalkaskaden untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Lipidvesikel,

die mit Phosphatidylserin angereichert waren (PS-LUVs) als Modell für apoptotische Zellen, die PS auf der Zelloberfläche präsentieren, verwendet. Mit Hilfe der PS-LUVs wurde die zeitabhängige und konzentrationsabhängige Bindung von PS an den PS-Rezeptor, die Expression des PS-Rezeptors durch unterschiedlich aktivierte Mikrogliazellen *in vitro* und die Verknüpfung des PS-Rezeptors mit Signaltransduktionskaskaden, die beispielsweise zu einem Kalziumsignal in der Mikrogliazelle führen untersucht. Des weiteren wurde untersucht, ob eine Bindung von PS-LUVs an putativen Rezeptoren zu einer Ausschüttung von Zytokinen oder Chemokinen durch die Mikrogliazelle führt.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Präparation der Körnerzellkulturen

Für die Herstellung der Körnerzellkulturen wurden sechs Tage alte Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet und nach der von Drejer und Mitarbeitern beschriebenen Methode vorgegangen (Drejer et al., 1985). Die Ratten wurden dekapitiert, die Schädeldecke geöffnet und das Kleinhirn entnommen. Das Kleinhirn wurde in eine Petrischale mit gekühltem „Hank's balanced salt solution“ (HBSS, Seromed/Biochrom, Berlin) überführt und die Hirnhäute entfernt. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und für sieben Minuten bei 37°C mit 1 % Trypsin (Boehringer, Mannheim) und 0,05 % DNase (Worthington, Lakewood, NY) in HBSS behandelt. Anschließend wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von serumhaltigem „Basal Medium Eagle“ (BME) Medium (Zusammensetzung siehe 3.1.5) gestoppt. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen pro Minute (Upm). Danach wurden die Zellen mit Hilfe einer feuerpolierten Pasteurpipette dissoziiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 800 Upm für 10 Minuten wurde die Suspension zur Entfernung größerer Gewebstücke gefiltert. Anschließend wurden die Zellen zur Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau (Sigma, Deisenhofen) angefärbt und die nicht gefärbten, lebenden Zellen ausgezählt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen auf Poly-L-Lysin (PLL, Sigma, Deisenhofen) beschichteten Deckgläsern in BME-Medium, welches 25 mM KCl enthielt, ausplattiert und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen wurde das BME-Medium gegen serumfreies Medium mit 25mM KCl (siehe 3.1.5) ausgetauscht. Das Medium enthielt zusätzlich 10 µM Cytosin Arabinofuranosid (Sigma, Deisenhofen), um die Proliferation von nichtneuronalen Zellen zu verhindern. Die Neuronenkulturen wurden nach sieben Tagen für die Experimente verwendet.

3.1.2 Präparation der Mikrogliazellkulturen

Mikrogliazellen wurden aus dem Kortex von neugeborenen Wistar Ratten bzw. NMRI Mäusen präpariert (Giulian und Baker, 1986; Nolte et al., 1996). Die Tiere wurden dekapitiert, das Gehirn entnommen und der Kortex herauspräpariert. Nach Entfernung der Hirnhäute und Blutgefäße wurden die Kortexhälften zweimal mit HBSS gewaschen, für 5-8 min mit 1 % Trypsin und 0,05 % DNase in HBSS inkubiert, nochmals zweimal mit HBSS gewaschen und mit Hilfe einer feuerpolierten Pasteurpipette dissoziiert. Nach Zugabe von serumhaltigem BME-Medium folgte eine Zentrifugation bei 800 Upm für 10 Minuten bei 4°C. Die Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 75 cm² Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) im BME-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) für Mikroglia der Ratte und im DMEM-Medium mit 10% FKS für Mikrogliazellen der Maus (Zusammensetzung siehe 3.1.5) ausplattiert. Nach einem Tag wurden die Kulturen dreimal mit Phosphatpuffer (PBS, Life Technologies/GibcoBRL, Eggenstein) gewaschen. Die Zellen wurden für 9-12 Tage in BME-Medium bzw. DMEM-Medium kultiviert, wobei das Medium jeden dritten Tag ausgetauscht wurde. Nach ungefähr neun Tagen bestand die Vorkultur aus einem konfluenten Astrozytenmonolayer, worauf sich Mikrogliazellen und - bei den Rattenkulturen - Oligodendrozyten befanden. Die Mikrogliazellen konnten durch leichtes Schütteln der Kulturflaschen von dem Astrozytenmonolayer abgelöst werden. Der Überstand wurde gesammelt, zentrifugiert und die resuspendierten Mikrogliazellen anschließend zu den Neuronen hinzugefügt oder in einer Dichte von 5×10^4 Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern (16 mm Durchmesser) bzw. in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Well in 96-Wellplatten (Greiner, Frickenhausen) in DMEM mit 2 % FKS (Zusammensetzung siehe 3.1.5) ausplattiert.

3.1.3 Medien

Das Kulturmedium „**Basal Medium Eagle**“ (BME) wurde für die Vorkulturen der Ratte verwendet:

BME (Seromed/Biochrome, Berlin)	
Penicillin	50 U/ml (Seromed/Biochrome, Berlin)
Streptomycin	50 µg/ml (Seromed/Biochrome, Berlin)
L-Glutamin	2 mM (Seromed/Biochrome, Berlin)
Fötales Kälberserum (FKS)	0,1 ml/ml (Life Technologies/GibcoBRL, Eggenstein)

Das Kulturmedium „**Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium**“ (DMEM) mit 10% FKS wurde für die Vorkulturen der Maus verwendet

DMEM (Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein)	
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
Fötale Kälberserum (FKS)	0,10 ml/ml

Das Kulturmedium „**Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium**“ (DMEM) mit 2% FKS wurde für die Mikrogliaulturen verwendet:

DMEM (Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein)	
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
Fötale Kälberserum (FKS)	0,02 ml/ml

Das Kulturmedium „**Basal Medium Eagle**“ (BME) mit 25 mM KCl wurde für die Kleinhirneuronenkulturen verwendet:

BME (Sigma, Deisenhofen)	
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
KCl	25 mM
Fötale Kälberserum (FKS)	0,1 ml/ml

Das Kulturmedium **Serumfreies Medium** mit 25 mM KCl wurde ebenfalls für die Kleinhirneuronenkulturen verwendet:

DMEM-Pulver	10 g/l (Sigma, Deisenhofen)
NaHCO ₃	1 g/l
Transferrin	100 µg/ml (Sigma, Deisenhofen)
Gentamycin	2 mg/ml (Seromed, Deisenhofen)
Insulin	10 µg/ml (Sigma, Deisenhofen)
Putreszin	16 µg/ml (Sigma, Deisenhofen)
Progesteron	62 ng/ml (Sigma, Deisenhofen)
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin	340 ng/ml (Sigma, Deisenhofen)
Natriumselenit	200 nM (Sigma, Deisenhofen)
L-Thyroxin	437 nM (Sigma, Deisenhofen)
BSA	10 µg/ml (Serva, Deisenhofen)
L-Glutamin	2 mM
Glukose	32 mM
KCl	25 mM

3.2 Auslösung der Apoptose in Kleinhirnneuronen

Apoptose in kultivierten Neuronen wurde durch die Zugabe von 100 μM des Stickstoffmonoxid (NO) Donors S-Nitroso-L-Cystein (SNOC) ausgelöst (Leist et al., 1997). Hierzu wurden 17,7 mg L-Cystein (Sigma, Deisenhofen) und 6,9 mg Natriumnitrit (Sigma, Deisenhofen) in einem Milliliter 100 mM Salzsäure gelöst (Lei et al., 1992). SNOC wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt. Nach Zugabe von SNOC zu den Kulturen wurde innerhalb weniger Minuten Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt (Beauvais und Joly, 1999).

3.3 Nachweis und Charakterisierung des apoptotischen Zelltods

Der Prozeß der neuronalen Apoptose wurde durch vier verschiedene Methoden charakterisiert, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

3.3.1 Untersuchung morphologischer Veränderungen mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops

Charakteristische morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen, wie die Kondensation der Zellen und die Bildung apoptotischer Körper, können mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops festgestellt werden (Duvall und Wyllie 1986). Die Neuronenkulturen wurden nach der Behandlung mit 100 μM SNOC mit dem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Telaval 31, Oberkochen) auf diese morphologischen Veränderungen hin überprüft und zur Dokumentation fotografiert.

3.3.2 Untersuchung der Membranintegrität und der Zellkernmorphologie mit Hilfe von DNA-Farbstoffen

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) (Boehringer, Mannheim), der sich in die DNA interkaliert, kann die Zellkernmorphologie untersucht und die Kondensation der Zellkerne identifiziert werden (zur Übersicht siehe Darzynkiewicz und Traganos, 1998). Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) (Sigma, Deisenhofen), der sich ebenfalls in die DNA interkaliert, markiert ausschließlich nekrotische Zellen, da der Farbstoff nicht membrangängig ist. Die durchlässige

Plasmamembran stellt ein Merkmal nekrotischer Zellen dar (Duvall und Wyllie 1986).

Die Kleinhirnneurone wurden fünf Minuten mit DAPI (Endkonzentration 1 µg/ml) und PI (Endkonzentration 5 µg/ml) in serumfreiem Medium mit 25 mM KCl inkubiert. Anschließend wurden die Neurone auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden für zehn Minuten mit 2 % Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert, mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger in einem Eindeckelmedium bestehend aus 76,9 g/l Mowiol (Hoechst, Frankfurt am Main), 2,5 % Diazabicyclo-[2.2.2]-Octan (DABCO, Sigma, Deisenhofen) und 31 % Glycerin in PBS eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Oberkochen), das mit Filtern zur Detektion von FITC, DAPI und PI ausgerüstet war. Die Anregungswellenlängen betrugen 480 nm für FITC, 360 nm für DAPI und 540 nm für PI die Emissionsmaxima liegen bei 535 nm für FITC, 460 nm für DAPI und bei 630 nm für PI. In zufällig gewählten Gesichtsfeldern wurde die Anzahl der Neurone mit kondensiertem Chromatin und die Anzahl der Neurone, die PI gefärbt waren, bestimmt. Hierbei wurden mindestens 200 Zellen pro Deckglas ausgezählt. Die Experimente wurden in Doppel- bzw. Dreifachansätzen durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) dargestellt.

3.3.3 Untersuchung der DNA-Fragmentation mit Hilfe des *in situ* Apoptose Detektions Tests

Eine Fragmentierung der DNA, wie sie bei apoptotischen Zellen vorkommt, kann mit Hilfe eines *in situ* Apoptose Detektions Tests von ONCOR (Gaithersburg, MD, USA) nachgewiesen werden. Hierbei werden Digoxigeninnukleotide mit Hilfe einer terminalen Deoxynukleotidyltransferase (TdT) an die 3' OH-Enden der DNA-Fragmente angefügt. In einem zweiten Schritt bindet ein fluoreszenzmarkierter anti-Digoxigenin Antikörper an das Digoxigenin der angefügten Nukleotide.

Für diese Nachweismethode wurden die auf Deckgläsern wachsenden Kleinhirnneurone fünf Minuten mit PI (Endkonzentration 5 µg/ml) im serumfreien Medium mit 25 mM KCl inkubiert. Anschließend wurden die Neurone auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen, für 30 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,1 % TritonX-100 für fünf Minuten permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen fünf Minuten mit Equilibrations Puffer (Oncor) inkubiert und

anschließend mit TdT-Lösung (Oncor) für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für zehn Minuten in eine Wanne mit Stop-Wasch-Puffer (Oncor) gegeben, dreimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem Fluoreszenz gekoppelten anti-Dioxigenin-Antikörper (Oncor) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Deckgläser mit Eindeckelmedium auf einen Objektträger eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Oberkochen), das mit Filtern zur Detektion von FITC, DAPI und PI ausgerüstet war (Wellenlänge siehe 3.3.2).

3.3.4 Untersuchung der Phosphatidylserin Präsentation auf der Außenseite der Plasmamembran mit Hilfe von Annexin-V

Der apoptotische Zelltod in den Neuronen konnte mit Hilfe von FITC-konjugierten Annexin-V (Boehringer Mannheim) detektiert werden. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, das auf der Außenseite der Plasmamembran apoptotischer Zellen exprimiert wird (van Engeland et al., 1998).

Zunächst wurden apoptotische Neurone zur Identifikation von nekrotischen Zellen für fünf Minuten mit PI (5 µg/ml) im Kultivierungsmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Annexin-Bindungspuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) gewaschen und für zwei Minuten mit Annexin-V-FITC (0,2 µg/ml) im Annexin-Bindungspuffer gefärbt. Nach erneutem Waschen mit Annexin-Bindungspuffer wurden die Deckgläser mit einem konfokalem Mikroskop (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA), ausgerüstet mit einem 488 nm Argonionen Laser, mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektivs (40x) untersucht. Die Speicherung und Anzeige der Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Programm Imagespace (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Die Präsentation erfolgte mit der PC-Standardsoftware.

3.4 Videomikroskopie

Mit Hilfe der Videomikroskopie können Zellbewegungen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden (Nolte et al., 1996). In dieser Arbeit wurden die Bewegungen der Mikroglia nach Zugabe zu apoptotischen Kleinhirnneuronen auf Deckgläsern aufgenommen. SNOC-behandelte Neurone auf Deckgläsern wurden in eine auf 37°C

Temperatur kontrollierte Inkubationskammer, in der sich serumfreies Medium mit 25 mM KCl befand, überführt. Die Kammer wurde auf den Objektisch eines inversen Mikroskops (Zeiss IM 100, Oberkochen), das mit einer Videokamera (C2400-07 Hamamatsu, Herrsching) verbunden war, montiert. Die Inkubationskammer wurde kontinuierlich mit Karbogen begast, um den pH-Wert des Mediums konstant auf pH 7,4 zu halten. Zu den Neuronen in der Inkubationskammer wurden 5×10^4 Mikrogliazellen gegeben. Die Mikrogliazellen setzten sich nach ungefähr 15 Minuten auf den Deckgläsern mit den apoptotischen Neuronen ab. Mit einem Videorecorder (Panasonic AG 6730) wurden im Zeitraffer-Modus Videobilder aufgenommen. Zur Dokumentation wurden einzelne Aufnahmen digitalisiert (Movieblaster, CPS, Hamburg, Deutschland).

3.5 Mikrochemotaxis Test

Die Motilität der Mikroglia in der Anwesenheit von Kulturüberständen von apoptotischen Neuronen wurde in einer 48-Well Mikrochemotaxiskammer (Neuroprobe Inc., Bethesda, MD, USA) untersucht (Abb.3). Die unteren Wells der Kammer wurden mit Zellkulturüberständen von Kontrollneuronen, von apoptotischen Neuronen (sechs Stunden nach einer SNOC-Behandlung) oder von nekrotischen Neuronen gefüllt. Zellkulturüberstände von nekrotischen Neuronen wurden erhalten, indem die Neurone durch mehrmaliges pipettieren durch eine sehr eng geschmolzene Pasteurpipette mechanisch lysiert wurden. Das obere und untere Kompartiment der Mikrochemotaxiskammer wurde durch einen PLL-beschichteten Polykarbonat Filter mit einer Porengröße von 5 μm (Poretics, Livermore, Ca, USA) getrennt. Mikrogliazellen ($2-3 \times 10^4$ in 50 μl serumfreiem Medium) wurden in das obere Kompartiment der Chemotaxiskammer gefüllt. Die Experimente wurden jeweils in Dreifachansätzen durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37°C wurden die Filter drei Minuten mit Diff-Quick (Baxter Diagnostics, Düringen, Schweiz) Fixierungslösung fixiert. Anschließend wurde für zwei Minuten mit Diff-Quick Färbelösung 1 eine eosinophile (rote) Färbung und anschließend für fünf Minuten mit Diff-Quick Färbelösung 2 eine basophile (blaue) Färbung durchgeführt. Die Filter wurden in Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet. Mit Hilfe eines feuchten Wattestäbchens wurden Zellen, die nicht durch den Filter gewandert waren, von der oberen Seite des Filters entfernt. Die Rate der gewanderten Mikrogliazellen wurde durch Auszählung der Zellen auf der unteren Filterseite in drei zufälligen Gesichtsfeldern (= 9 Felder pro Versuchsgruppe) bestimmt.

Hierzu wurde ein 40-faches Hellfeld Objektiv verwendet. Die Anzahl der gewanderten Mikrogliazellen in der Gegenwart von apoptotischen bzw. nekrotischen Überständen wurden gegen die Anzahl der gewanderten Mikrogliazellen in Gegenwart von Kontrollüberständen normalisiert und als Prozent der Kontrolle dargestellt.

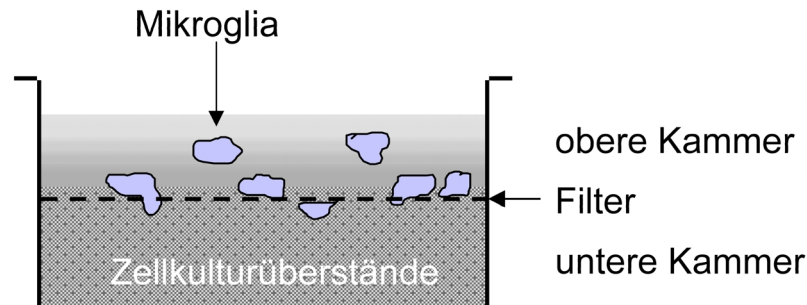


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Chemotaxisansatzes

3.6 Phagozytoseassay

Zur Untersuchung der Bindungsmechanismen zwischen Mikrogliazellen und apoptotischen Neuronen war es notwendig, einen geeigneten Phagozytoseassay zu entwickeln. Hierfür wurden zwei Stunden nach der SNOC-Behandlung der Neurone Mikrogliazellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/cm² auf die apoptotischen Neurone gegeben. Diese Kokultur wurde für weitere sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte zur Identifikation nekrotischer Zellen für fünf Minuten eine Inkubation mit PI (5 µg/ml). Die Kulturen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Deckgläser für 30 Minuten mit 10 µg/ml FITC-konjugiertem Lektin von *Griffonia simplicifolia* (Isolektin B4-FITC; Boehringer Mannheim), welches die Mikrogliazellen färbt (Streit, W. J., 1990), und DAPI, zur Identifikation der apoptotischen Zellen, (1 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und auf einen Objektträger in Mowiol-Eindeckelmedium eingebettet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. In zufällig gewählten Gesichtsfeldern wurde die Anzahl der Mikroglia, die kondensierte Zellkerne apoptotischer Neurone enthielten, bestimmt. Hierbei wurden mindestens 100 Zellen pro Deckglas ausgezählt. Die Experimente wurden in Doppel- bzw. Dreifachansätzen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrolle (Kontrolle = Mikroglia Phagozytose in unbehandelten Neuronenkulturen) normalisiert und als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

3.7 Effekt löslicher Inhibitoren

Um potentielle Erkennungsmechanismen kompetitiv zu blockieren, wurden 15 Minuten vor Zugabe der Mikrogliazellen im Phagozytoseassay potentielle Inhibitoren in das Neuronenmedium gegeben. Als potentielle Inhibitoren wurden Glukose (Merck, Darmstadt), Mannose (Sigma, Deisenhofen), Fukose (Sigma, Deisenhofen), Galaktose (Sigma, Deisenhofen), N-Acetylglukosamin (Sigma, Deisenhofen), N-Acetylgalaktosamin (Sigma, Deisenhofen), Glukosamin (Sigma, Deisenhofen), Mannosamin (Sigma, Deisenhofen), das Tetrapeptid Argenin-Glycin-Asparagin-Serin (RGDS, Sigma, Deisenhofen), das Kontrollpeptid Argenin-Glycin-Glutamin-Serin (RGES, Sigma, Deisenhofen) oder die wasserlösliche Kopfgruppe des Phosphatidylserins, O-Phospho-L-Serin (Sigma, Deisenhofen), verwendet. Die Monosaccharide lagen alle in D(+)-steroisomerer Form vor. Die Stammlösungen der Inhibitoren wurden in Wasser angesetzt und der pH auf 7.4 eingestellt.

3.8 Neutralrottest

Um einen unspezifischen, toxischen Effekt der gelösten Inhibitoren (siehe 3.7) auf Mikrogliazellen zu untersuchen wurden Neutralrottests (Borenfreund und Puerner, 1986) durchgeführt. Die Mikrogliazellen wurden in einer 96 Well Platte (2×10^4 Zellen/Well) kultiviert und für drei Stunden in der Anwesenheit von Monosacchariden, Peptiden und Phospho-L-Serin inkubiert. Neutralrot (Merck, Darmstadt) wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/ml in das Kulturmedium gegeben und die Kulturen wurden für weitere drei Stunden inkubiert. Der Farbstoff, der von den lebenden Zellen aufgenommen wird (Babich und Borenfreund, 1990), konnte durch 10 minütiges Schütteln in essigsaurem Alkohol (10 % Alkohol und 1 % Essigsäure) extrahiert und spektrophotometrisch bei 540 nm mit einem ELISA Reader (Wallac-ADL-GmbH, Freiburg) bestimmt werden. Insgesamt wurden fünf Experimente durchgeführt und für jede eingesetzte Substanz sechs Parallelwerte bestimmt. Die Kontrolldaten wurden von Zellen, die unter gleichen Bedingungen ohne Inhibitoren kultiviert wurden, ermittelt. Mikrogliazellen, die zuvor mit 2% Paraformaldehyd für 15 min inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle.

3.9 Bindung von Lipidvesikeln an Gliazellen

Um eine mögliche Phosphatidylserin Erkennung bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Mikroglia näher zu untersuchen, wurden Lipidvesikel, die mit Phosphatidylserin angereichert waren, als apoptotisches Zellmodell verwendet. Diese Lipidvesikel (Large unilamellar vesicles“ (LUVs)) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann aus der Humboldt Universität zur Verfügung gestellt. Vier Sorten von LUVs gelöst in HEPES gepufferter Salzlösung (150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7.4) wurden eingesetzt:

- A) Phosphatidylcholin (PC)-LUVs, die aus Phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen) und 1 % Rhodamin markiertem Phosphatidylethanolamin (Sigma, Deisenhofen) bestanden, dienten als Modell für nicht apoptotische Zellen.
- B) Phosphatidylserin (PS)-LUVs, die aus Phosphatidylcholin, 10 %, 1 % oder 0,1 % Phosphatidylserin (Sigma, Deisenhofen) und 1 % Rhodamin markiertem Phosphatidylethanolamin bestanden, dienten als Modell für apoptotische Zellen.

Der Durchmesser der Lipidvesikel betrug etwa 0.1 μ m. Die Lipid Konzentration in den Proben betrug 1 mM.

Mit Hilfe der LUVs erfolgte die Untersuchung der PS-Bindung an Mikrogliazellen und anderen Gliazellen. Die untersuchten Kriterien waren:

- A) Zeitabhängige Bindung der LUVs an Mikroglia
- B) Abhängigkeit der Bindung durch Mikroglia von der PS-Konzentration in den LUVs
- C) Abhängigkeit der Bindung vom Aktivierungszustand der Mikrogliazelle:
 - a) Mikroglia unter normalen Kulturbedingungen
 - b) mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) aktivierte Mikrogliazellen
 - c) mit astrozytenkonditioniertem Medium kultivierte Mikrogliazellen
- D) Bindung der LUVs an Oligodendrozyten und Astrozyten

Für die Versuche wurden die Zellen, die sich auf Deckgläsern befanden, mit 10 µl der jeweiligen LUV-Lösung in 200 µl Kulturmedium unterschiedlich lange inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen, 15 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträger mit Eindeckelmedium eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiophot, Oberkochen), das mit Filtern zur Detektion von FITC, DAPI und PI ausgerüstet war (Wellenlängen siehe 3.3.2).

3.10 Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Mikroglia

Um eine mögliche Aktivierung der Mikrogliazellen durch die Lipidvesikel zu untersuchen, wurde die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Mikrogliazellen nach einer Inkubation mit den LUVs bestimmt.

Mikrogliazellen kultiviert in 96-Wellplatten in BME Medium mit 2 % FKS wurden für 15 Stunden mit 2 µl LUV-Lösung pro Well behandelt. Zusätzlich wurden einige Mikrogliazellen mit 100 ng/ml LPS (*Escherichia coli* K-235, Sigma, Deisenhofen) behandelt. Die LPS Behandlung diente als Positivkontrolle. Nach der Inkubation wurde der Gehalt von den Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-12 und den Chemokinen KC und MIP1- α in den Überständen mit Hilfe spezifischer ELISAs (FactorTestTM und IntertestTM, Genenzym Virotech, Rüsselsheim für IL-12; QuantikineTM M, R&D Systems, Wiesbaden für TNF α , IL-6, KC und MIP1 α) untersucht. Hierzu wurden 96-Wellplatten zunächst mit einem Antikörper beschichtet. Die Platten wurden zum Absättigen unspezifischer Bindungen mit Blockierungspuffer, der Proteine enthielt, vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände aus den durchgeführten Versuchen in diese 96-Wellplatten überführt und für die jeweiligen ELISAs entsprechend der Angaben der Hersteller inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Platten wurden diese mit einem biotylinierten Antikörper inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Platten mit Streptavidin- α -HPR („Horseradish Peroxidase conjugated Streptavidin“) inkubiert. Anschließend wurden die Platten mehrmals gewaschen und mit Tetramethylbenzidin (TMP) inkubiert. Die Farbreaktion wurde gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem Photometer für 96-Wellplatten (STL, Spectra, LabInstruments Deutschland GmbH, Crailsheim) gemessen. Die Proteinmengen in den Zelllysaten wurden mit Hilfe des MicroBCA Proteintests (Pierce, Rockford, IL, USA) ermittelt. Die Ausschüttung der Zytokine und Chemokine

wurde als pg pro μg Zellprotein bestimmt und auf die Zytokin- bzw. Chemokin-Ausschüttung durch eine LPS Behandlung der Mikrogliazellen normalisiert und als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

3.11 Messung von Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Identifikation möglicher Änderungen der intrazellulärer Kalziumkonzentration durch Bindung von Lipidvesikeln an Mikrogliazellen wurden Messungen des intrazellulären Kalziumgehalts an Mikrogliazellen durchgeführt.

Der hier verwendete Kalziumindikator Fura-2-Acetoxymethyl-Ester (Fura-2-AM, Molecular Probes, Eugene, USA) ändert durch die Bindung von Kalzium seine Fluoreszenzeigenschaft und zeigt eine Verschiebung seines Emmisionsspektrums (Grynkiewicz et al., 1985). Dieser ratiometrische Farbstoff ermöglicht durch die Verhältnisbildung der Fluoreszenz bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen eine Angabe der intrazellulären Kalziumkonzentration (Grynkiewicz et al., 1985).

Die Beladung der kultivierten Mikrogliazellen erfolgte durch 30 minütige Inkubation der Deckgläschen mit 5 μM Fura-2-AM (Stammlösung: 5 mM in DMSO) gelöst in HEPES-Lösung (150 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2,0 mM CaCl_2 , 1,0 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7,4). Für die Kalziummessungen wurden die Fura-2 gefüllten Mikrogliazellen in eine Plexiglasmeßkammer transferiert. Diese Kammer war auf dem Mikroskopkreuztisch (inverses Mikroskop, Zeiss IM100, Oberkochen) montiert und wurde kontinuierlich mit HEPES-Lösung durchspült. Die Lipidvesikel wurden in einer Konzentration von 100 μM mit einer Glaspipette, die mit Hilfe eines Mikromanipulators (Eppendorf, Hamburg) in die Nähe der Zellen plaziert wurde, appliziert. Die Glaspipetten wurden aus Borosilikatglas mit einem horizontalen Elektodenziehgerät (Modell P-2000 und P87, Sutter Instruments, Navato, USA) gezogen. Fura-2 wurde mit Hilfe einer UV-Lampe und Filtern mit 340 nm und 380 nm angeregt. Die Fluoreszenz bei 520 nm wurde alle 3 Sekunden mit 512 x 480 Bildpunkten durch eine lichtverstärkte CCD-Kamera (C2400, Hamamatsu, Herrsching) aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde mit einer Bildanalysesoftware (Vprobe, ETM Systems, Mountain View, USA) und PC-Standardsoftware gemessen und ausgewertet. Die Darstellung der Kalziumsignale erfolgt durch Angabe des Verhältnisses der Fluoreszenz von 340 nm zu 380 nm.

3.12 Quantifikation/ Statistik

Mit Hilfe von PC-Standardsoftware wurden die Mittelwerte und Standardfehler (\pm SEM) der Meßwerte aus den einzelnen Versuchen ermittelt. Für die weitere Auswertung wurden die Daten in Prozent auf die jeweiligen Kontrolldaten bezogen. Die Meßwerte aus den Kontrollversuchen entsprachen hierbei 100 %. Die aufgenommenen Daten wurden auf diese Weise normiert, um sie untereinander vergleichbar zu machen.

Zur Signifikanzanalyse wurde mit der Sigma Stat Software (Jandel Scientific, Chicago, IL,USA) ein Mann-Whitney Rank Sum Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Die Signifikanzgrenze lag bei $p = 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Kleinhirnneurone als apoptotisches Modellsystem

Zur Untersuchung der Bindungsmechanismen zwischen apoptotischen Zellen des zentralen Nervensystems und Mikrogliazellen war es notwendig, ein neuronales Zellmodell zu etablieren, in dem ein apoptotischer Zelltod synchron in möglichst vielen Neuronen ausgelöst werden konnte. Neuronenkulturen aus dem Kleinhirn boten sich zu diesem Zweck an, da in diesen Kulturen die Auslösung eines apoptotischen Zelltods bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht wurde (D'Mello et al., 1993; Leist et al., 1997; Chang und Wang, 1997). Ein apoptotischer Zelltod kann in diesen Kleinhirnneuronen beispielsweise durch einen Austausch des Kulturmediums mit hohen Kaliumkonzentrationen (25 mM) gegen Kulturmedium mit niedrigen Kaliumkonzentrationen (5 mM) oder durch die Zugabe von Stickstoffmonoxid (NO) Donatoren ausgelöst werden (Bonfoco et al., 1995; Armstrong et al., 1997; Leist et al., 1997; Chang und Wang, 1997).

Für diese Arbeit wurde ein apoptotischer Zelltod in den Kleinhirnneuronen mit dem NO-Donator S-Nitrosocystein (SNOC) ausgelöst. Hierzu wurde, wie im Methodenteil (3.2) beschrieben, SNOC in einer Konzentration von 100 μ M den Neuronenkulturen beigelegt.

4.1.1 Nachweis des apoptotischen Zelltods in den Kleinhirnneuronen

Ob durch NO-Donatoren überwiegend ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod von Neuronen ausgelöst wird, hängt von den eingesetzten Konzentrationen der Donatoren und den Kulturbedingungen der Neurone ab (Bonfoco et al., 1995; Nicotera et al., 1997a). Unter Zellkulturbedingungen folgt dem apoptotischen Zelltod immer eine sekundäre Nekrose, da sich im allgemeinen keine Phagozyten in den Kulturen befinden (Bonfoco et al., 1995). Daher war es notwendig, den Zeitverlauf des durch SNOC ausgelösten Zelltods in den Kleinhirnneuronenkulturen zu charakterisieren. Die Charakterisierung des Zelltods erfolgte anhand morphologischer und biochemischer Merkmale des apoptotischen und nekrotischen Zelltods.

4.1.1.1 Nachweis der für Apoptose spezifischen morphologischen Veränderungen

Charakteristische morphologische Merkmale eines apoptotischen Zelltods sind Schrumpfung der Zelle, Bläschenbildung der Membran und Zerfall der Zelle in vesikuläre Strukturen (apoptotische Körper) und können im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden (Duvall und Wyllie 1986). Aus diesem Grund wurden die Neuronenkulturen des Kleinhirns nach der Zugabe von 100 μM SNOC alle 30 Minuten mikroskopisch untersucht.

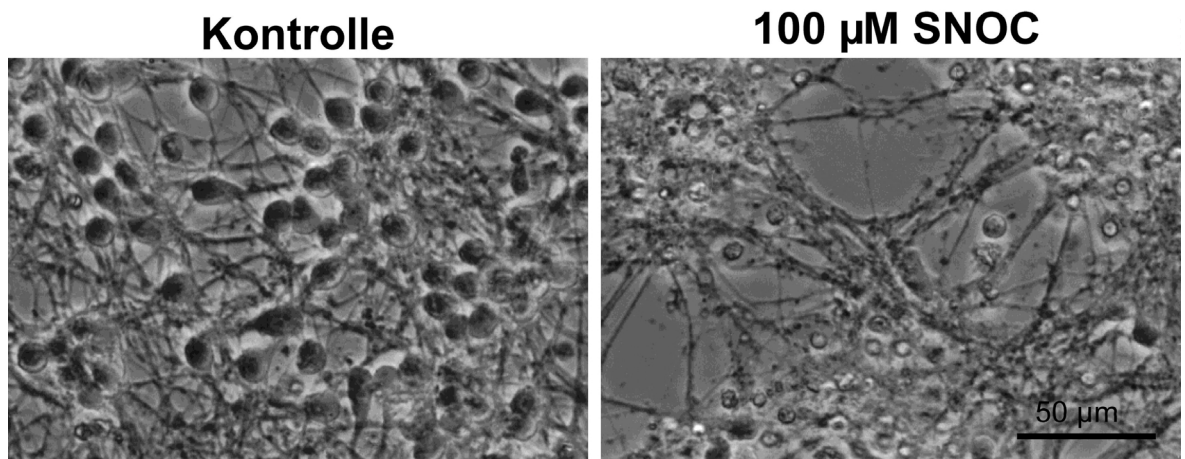


Abbildung 4: Für Apoptose spezifische morphologische Veränderungen der Kleinhirnneurone nach einer SNOC-Behandlung.

Kultivierte Kleinhirnneurone der Ratte wurden mit 100 μM S-Nitrosocystein (SNOC) behandelt und nach vier Stunden unter Phasenkontrastbeleuchtung fotografiert. Auf der linken Seite sind unbehandelte Kontrollneurone und auf der rechten Seite Neurone vier Stunden nach einer SNOC-Behandlung dargestellt.

Erste morphologische Zeichen einer Apoptose, wie Schrumpfung der Neurone und eine Zerstörung des Neuritennetzwerkes aufgrund einer Fragmentation der Neurone konnten frühestens zwei Stunden nach der SNOC-Behandlung festgestellt werden und waren vier Stunden nach der SNOC-Behandlung in der gesamten Kultur deutlich erkennbar (Abb.4).

4.1.1.2 Nachweis einer DNA-Fragmentation

Ein biochemisches Merkmal der Apoptose ist die enzymatische Fragmentation der DNA (Bredesen 1995; Nicotera und Leist, 1997) Nicotera und Leist, 1997. Isolierte DNA aus apoptotischen Zellen, die elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt wurde, bildet daher ein charakteristisches Leitermuster im Gel aus (Gong et al., 1994;

Darzynkiewicz und Traganos, 1998). Eine weitere Methode zum Nachweis apoptotischer Fragmentation der DNA ist die in situ Markierungen der Strangenden der DNA (Gorczyca et al., 1992; Darzynkiewicz und Traganos, 1998).

Dazu wurde in den Kleinhirnneuronen die sogenannte ApopTag-Färbung (Oncor; Gaithersburg, USA) durchgeführt, wobei die DNA-Enden fluorometrisch markiert wurden (siehe Methodenteil 3.3.3). Da es auch während des nekrotischen Zelltods in geringem Maße zu DNA Strangbrüchen kommt, wurden die Zellen zusätzlich mit PI gefärbt (siehe Methodenteil 3.3.3).

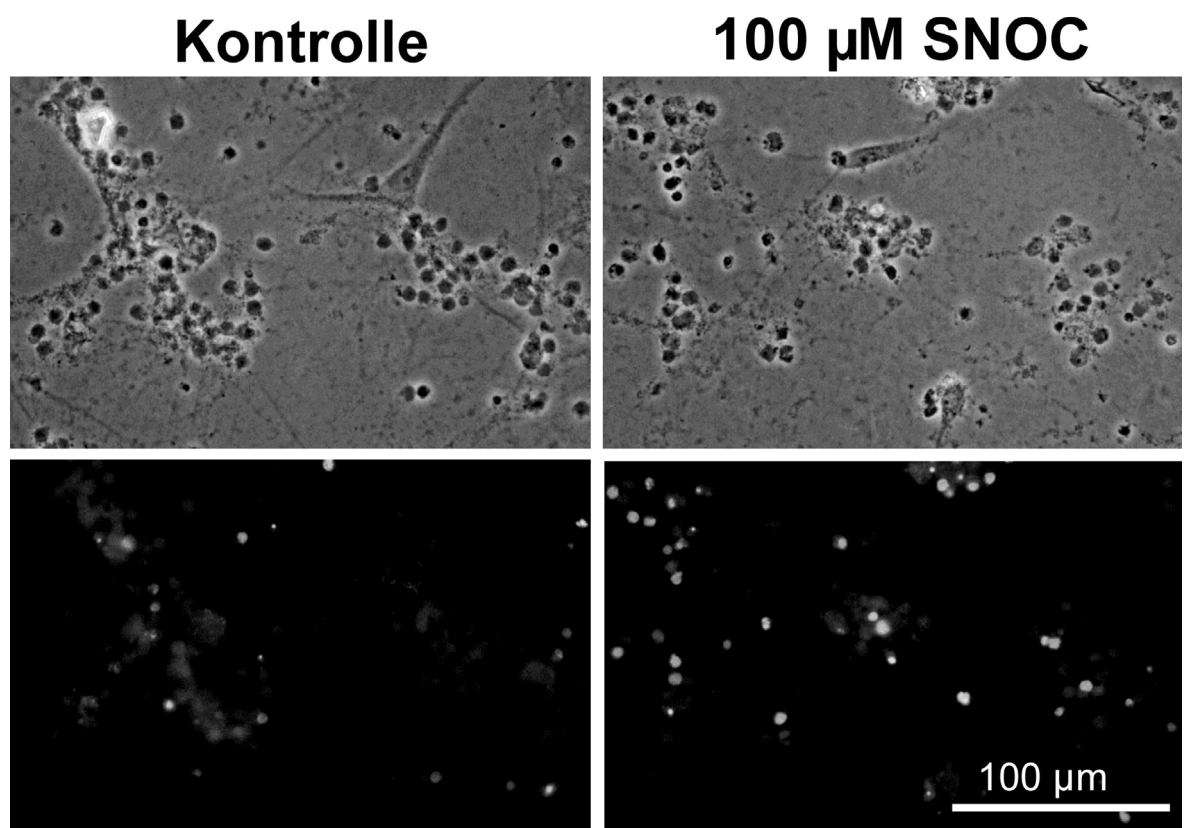


Abbildung 5: ApopTag-positive Kleinhirnneurone nach einer Behandlung mit 100 µM SNOC.

Körnerzellen in unbehandelten (Kontroll-) Kulturen (linke Abbildungen) und 18 Stunden nach der SNOC-Behandlung (rechte Abbildungen) wurden durch ApopTag-Färbung markiert. Die Phasenkontrast-Aufnahmen sind in den oberen Bildern dargestellt. Die ApopTag-Färbungen sind in den unteren Bildern dargestellt.

18 Stunden nach einer SNOC-Behandlung wies ein Großteil der Neurone, im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollneuronen, eine intensive ApopTag-Färbung im Zellkern auf (Abb.5). Einige dieser ApopTag-positiven Neurone zeigten ebenfalls eine PI-Färbung (nicht dargestellt). Es liegt nahe, daß es sich bei diesen Neuronen um sekundär nekrotische Zellen handelt (siehe 4.1.1.3).

4.1.1.3 Nachweis einer Chromatinkondensation

Morphologische Merkmale des apoptotischen Zelltods, wie die Kondensation des Chromatins und die zum Teil auch stattfindende Fragmentation des Zellkerns können mit Hilfe von DNA-Farbstoffen, wie 4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) nachgewiesen werden (Übersicht: Darzynkiewicz und Traganos, 1998). In den Zellkernen mit kondensiertem Chromatin kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität.

Zum Nachweis einer Chromatinkondensation und einer Fragmentation des Zellkerns wurden unbehandelte Kleinhirneurone und Kleinhirneurone nach unterschiedlichen Zeiten nach einer SNOC-Behandlung mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt (siehe Methodenteil 3.3.2). Zum Nachweis nekrotischer Zellen wurden die Zellen mit dem membranimpermeablen DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PI) angefärbt. Die Anzahl der Neurone mit kondensiertem Chromatin oder PI-markierten Zellkernen in den Kleinhirneuronenkulturen wurde wie im Methodenteil (3.3.2) beschrieben ermittelt.

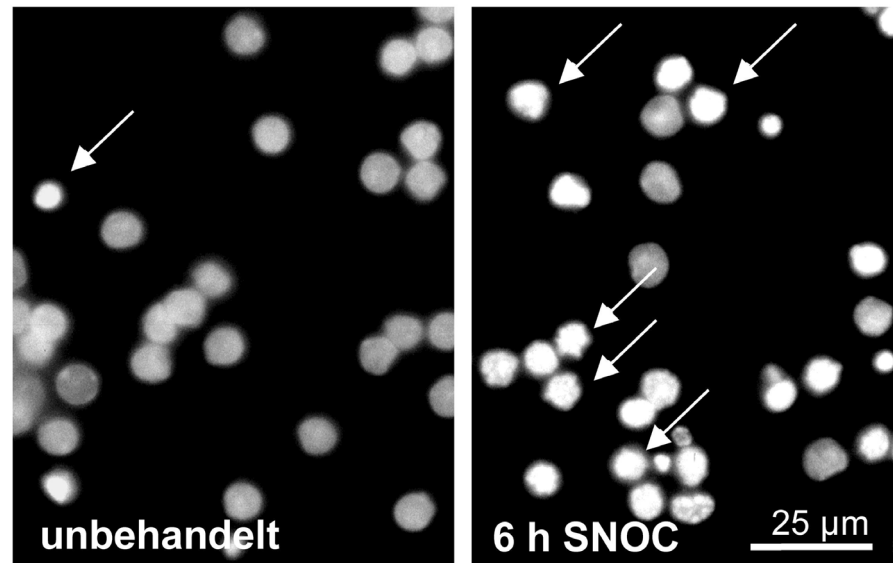
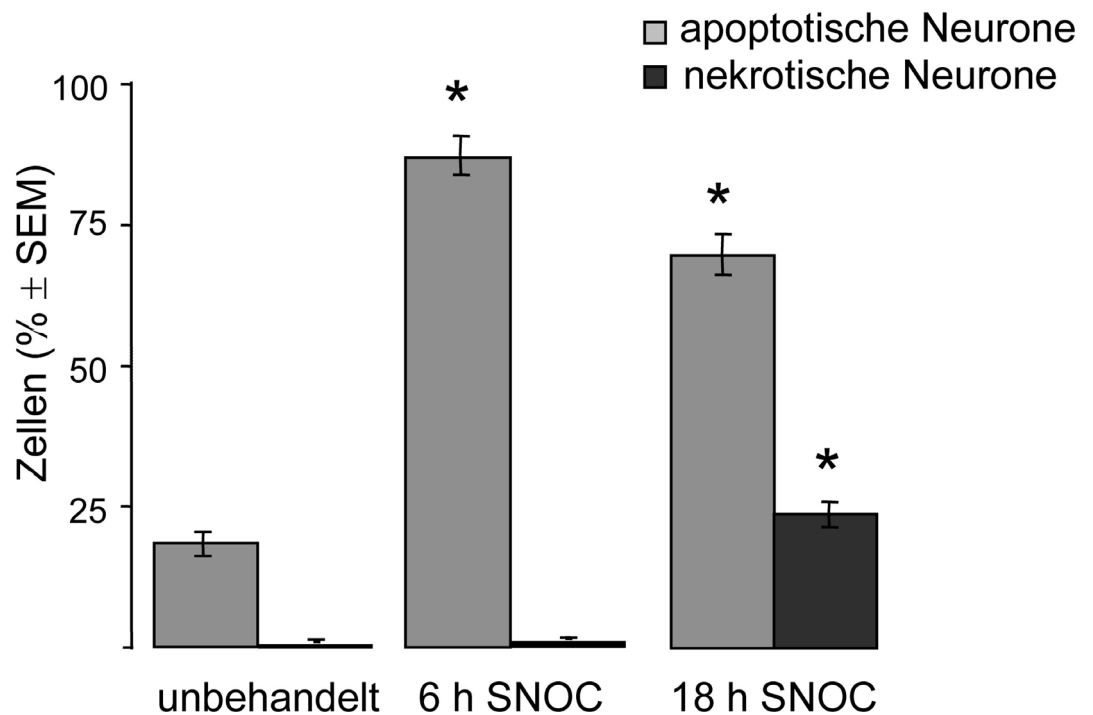
A**B**

Abbildung 6: Apoptotischer und nekrotischer Zelltod in den Körnerzellen des Kleinhirns nach einer Behandlung mit 100 μ M S-Nitroso-L-Cystein.

A: DAPI-Färbung in Kontrollkulturen (linke Abbildung) und sechs Stunden nach einer Behandlung mit 100 μ M SNOC (rechte Abbildung). Apoptotische Neurone werden durch ihre kondensierten Zellkerne und das kondensierte Chromatin charakterisiert (Pfeile).

B: Unbehandelte (Kontroll-) und SNOC-behandelte Neuronenkulturen wurden mit DAPI und PI gefärbt. Der Prozentsatz apoptotischer und nekrotischer Neurone wurde durch Auszählung von fünf zufällig ausgewählten Feldern auf den Deckgläsern ermittelt. Eine spontane Apoptose konnte in den Kontrollkulturen festgestellt werden; eine sekundäre Nekrose konnte 18 Stunden nach der SNOC-Behandlung beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM dargestellt, die von 23 Experimenten für die sechs Stunden Werte und 11 Experimenten für die 18 Stunden Werte erhalten wurden. * $p < 0,05$

Sechs Stunden nach einer Behandlung der Kleinhirnneurone mit 100 μ M SNOC besaßen die Mehrzahl der Neurone ($86.2 \% \pm 3.0 \%$) kondensiertes Chromatin im Zellkern und waren apoptotisch (Abb. 6). Ein nekrotischer Zelltod war sechs Stunden nach einer SNOC-Behandlung – verglichen mit unbehandelten Kontrollkulturen - kaum erkennbar ($0.3 \pm 0.1 \%$) (Abb.6). Eine Behandlung der Kleinhirnneurone mit 100 μ M SNOC löste also keinen nekrotischen Zelltod aus. 18 Stunden nach der SNOC-Behandlung konnte eine signifikante Zunahme des nekrotischen Zelltods ($23.6 \pm 2.2 \%$) festgestellt werden, während der Prozentsatz apoptotischer Neurone abnahm ($69.2 \pm 3.8 \%$). Diese PI-markierten Zellen wiesen häufig einen kondensierten Zellkern auf. Dies läßt darauf schließen, daß eine sekundäre Nekrose stattgefunden hatte. In der Kontrollkultur, die nicht mit SNOC behandelt wurde, wiesen ebenfalls einige Zellen kondensierte Zellkerne auf ($18.3 \pm 2.2 \%$, von 6.6 bis 45.7 %; n = 23). Es handelte sich hierbei um spontan apoptotische Zellen (Abb.6).

4.1.1.4 Nachweis von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran

Während des apoptotischen Zelltods kommt es zu einer Präsentation von Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Plasmamembran (van den Eijnde et al., 1998; van Engeland et al., 1998). Mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Proteins Annexin-V, welches an negativ geladene Phospholipide wie PS bindet, können PS präsentierende apoptotische Zellen markiert werden (Koopman et al., 1994; Darzynkiewicz und Traganos, 1998). Die Präsentation von PS auf der Außenseite der Plasmamembran wird als ein früher Marker des apoptotischen Zelltods angesehen, da die Präsentation von PS in vielen apoptotischen Zellen bereits vor der nukleären Kondensation auftritt (van Engeland et al., 1998).

Zum Nachweis der PS Präsentation wurden die SNOC behandelten Kleinhirnneurone mit FITC-konjugierten Annexin-V gefärbt (siehe Methodenteil 3.3.4). Zum Nachweis nekrotischer Zellen wurde diese Färbung mit einer PI-Färbung kombiniert. Im direkten Anschluß an die Färbung wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops untersucht. Auf Ebene der Zellkörper wurden die mit Annexin angefärbten Membranen als Ringe sichtbar (Abb.7).

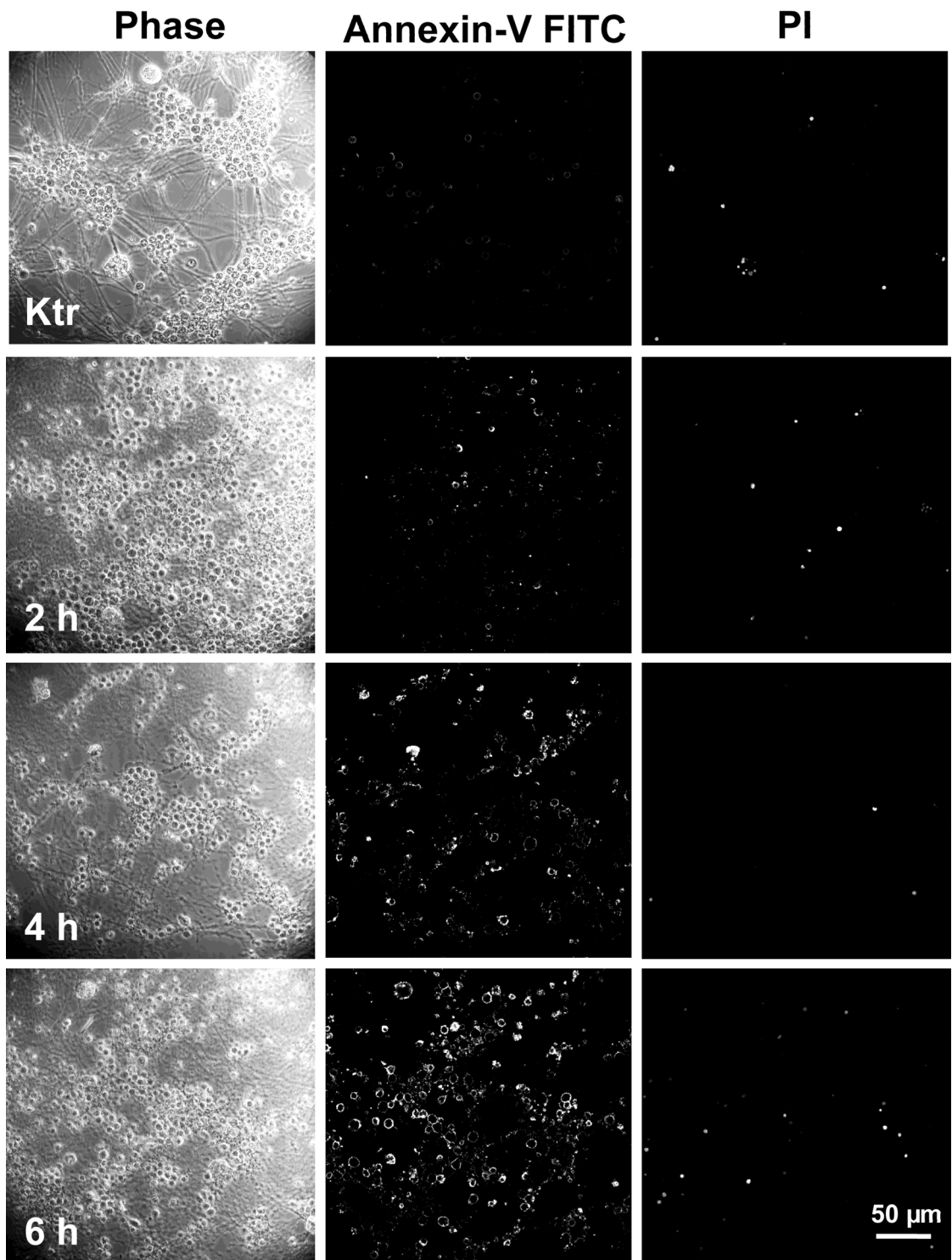


Abbildung 7: Phosphatidylserin wird im Verlauf der SNOC induzierten Apoptose früh auf der Oberfläche der Neurone präsentiert.

Unbehandelte (Ktr) Körnerzellen und nach verschiedenen Zeitpunkten (2, 4 und 6 Stunden) mit SNOC behandelte Körnerzellen. Die Phasenkontrastaufnahmen sind auf der linken Seite dargestellt. Die Präsentation von Phosphatidylserin auf der äußeren Seite der Plasmamembran wurde mit Hilfe des FITC-konjugierten Annexin-V markiert und ist in den mittleren Abbildungen zu sehen. Die PI gefärbten Kerne der nekrotischen Zellen sind in der rechten Abbildung dargestellt. Die Abbildungsserie zeigt einen repräsentativen Versuch aus drei unabhängigen Versuchen.

In den mit Annexin-V gefärbten unbehandelten Kontrollkulturen konnten wenige Annexin-V-positive Zelle beobachtet werden (Abb.7). Zwei Stunden nach der Behandlung mit 100 μ M SNOC wurde eine Zunahme von Annexin-V-positiven Neuronen beobachtet (Abb.7). Eine Behandlung der Kleinhirnneurone mit 100 μ M SNOC löst also schnell den apoptotischen Zelltod in den Neuronen aus. Vier Stunden nach der SNOC-Behandlung nahm die Anzahl Annexin-positiver Zellen weiter zu und sechs Stunden nach der SNOC-Behandlung war der größte Teil der Neurone Annexin-V-positiv (Abb.7). Somit zeigt die Annexin-Markierung, daß innerhalb des Untersuchungszeitraumes von sechs Stunden die Mehrheit der Neurone apoptotische wurden, wenn auch nicht in allen Neuronen synchron PS auf der Außenseite präsentiert wurde. Die Anzahl nekrotischer Zellen nahm im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen nicht zu (Abb.7). Innerhalb der ersten sechs Stunden nach der SNOC-Behandlung konnte also keine sekundäre Nekrose festgestellt werden.

4.2 Apoptotische Neurone produzieren keine löslichen Signale, die eine chemotaktische Reaktion in Mikrogliazellen hervorrufen.

Apoptotische Zellen im peripheren Immunsystem produzieren keine löslichen Signale, die auf professionelle Phagozyten chemotaktisch wirken (Savill et al., 1993). Die Erkennung apoptotischer Zellen im peripheren Immunsystem erfolgt ausschließlich über Zell-Zell-Kontakte (Savill et al., 1993). Um zu überprüfen, ob im zentralen Nervensystem gleiche Gesetzmäßigkeiten wie im peripheren Immunsystem herrschen, wurden in dieser Arbeit die Überstände von apoptotischen Neuronen auf das Potential hin untersucht, eine Migration der Mikrogliazellen in einem Mikrochemotaxistest auszulösen (siehe Methodenteil 3.5). Zusätzlich wurden die Bewegungen der Mikrogliazellen in apoptotischen Neuronenkulturen auf zielgerichtete Bewegungen zu apoptotischen Neuronen hin mit Hilfe von Zeitraffervideomikroskopie untersucht. Zielgerichtete Bewegungen der Mikrogliazelle weisen auf chemoattraktive Substanzen hin.

Für die Mikrochemotaxisexperimente wurden Überstände von unbehandelten Kontrollneuronen, SNOC behandelten Kleinhirnneuronen und lösliche Überstände von mechanisch zerstörten, nekrotischen Neuronen verwendet. Diese Überstände, die von sieben unterschiedlichen Präparationen stammten, wurden im Mikrochemotaxis Test eingesetzt (siehe Methodenteil 3.5) (Abb.8).

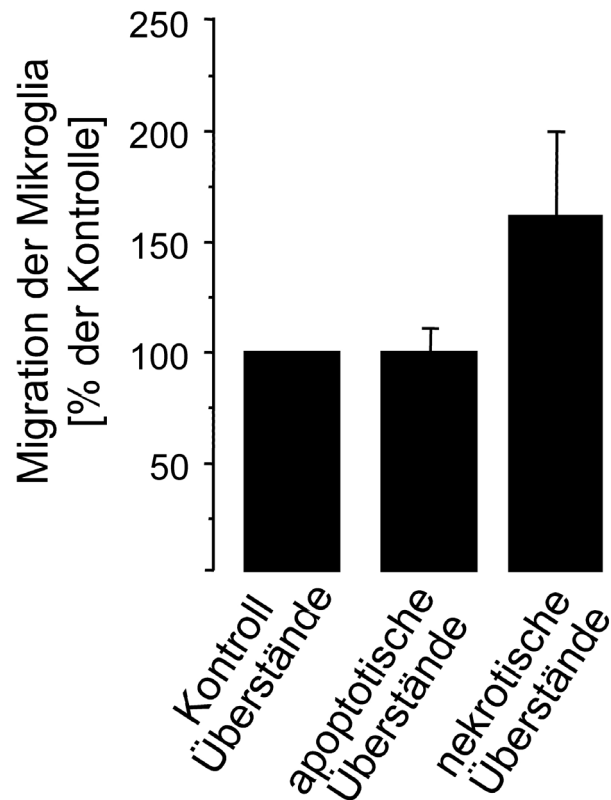


Abbildung 8: Kulturüberstände von apoptotischen Neurone besitzen keine chemotaktische Wirkung auf Mikroglia.

Überstände von unbehandelten Neuronen, SNOC-behandelten und mechanisch zerstörten Neuronen wurden in einem Mikrochemotaxistest auf ihr Potential getestet, eine mikrogliale Migration auszulösen. Überstände von apoptotischen Neurone besaßen keine chemotaktische Wirkung, während Überstände von nekrotischen Zellen in drei von sieben Experimenten eine deutliche chemotaktische Reaktion hervorriefen. Die Experimente wurden mit dreifach Ansätzen durchgeführt. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte von 7 Experimenten, ausgedrückt als Migration und deren Standardfehler (\pm SEM) im Vergleich zur Migration in Kontrollkulturen dar und wurden auf die Migration der Kontrollneurone norminiert.

Obwohl die einzelnen Präparationen sich in ihrem migrationsfördernden Potential auf Mikrogliazellen unterschieden, gab es keine signifikante Induktion der Mikroglia Chemotaxis durch Überstände von apoptotischen Neuronen im Vergleich zu den Überständen der jeweiligen unbehandelten Kontrollneuronen (Abb.8). Im Gegensatz dazu stimulierten die löslichen Überstände von neuronalen Zellextrakten in drei von sieben Präparationen die Mikroglia Migration (Abb.8). Diese Ergebnisse zeigen, daß apoptotische Neurone keine löslichen Substanzen produzieren, die chemoattraktiv auf Mikrogliazellen wirken.

Für die Videozeitraffer Beobachtungen (siehe Methodenteil 3.4) wurden Mikrogliazellen zwei Stunden nach der SNOC-Behandlung auf die Neuronenkulturen gegeben.

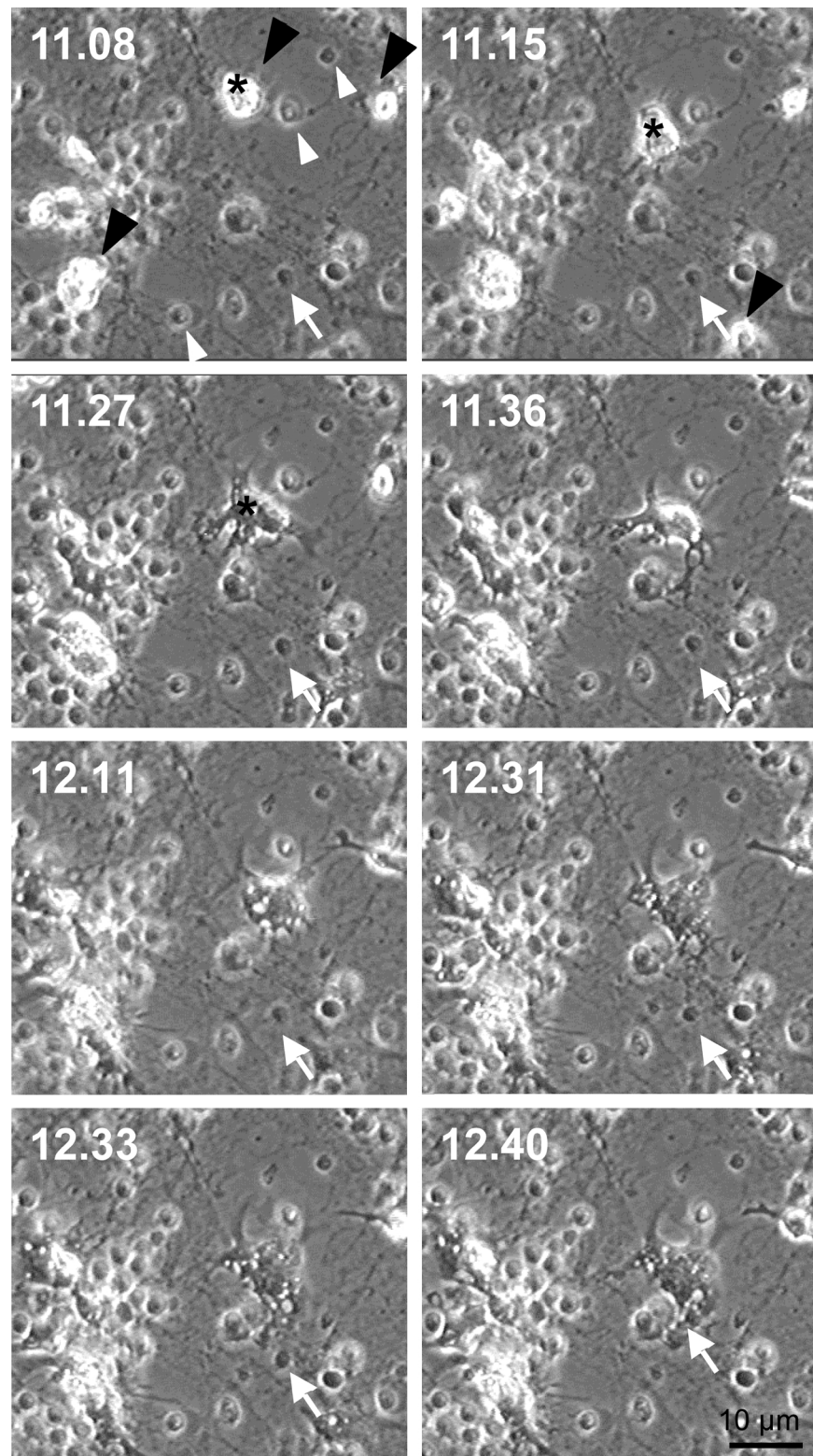


Abbildung 9: Video Zeitraffer Aufnahmen von Mikrogliazellen, die zu apoptotischen Neuronen gegeben wurden.

Zwei Stunden nach der SNOC-Behandlung der Neurone wurden Mikrogliazellen (schwarze Pfeilspitze) zu der Kultur gegeben. Die Beobachtungszeit ist jeweils oben links vermerkt. Nachdem sich die Mikroglia am Substrat angeheftet hatten, bewegten sich ihre Lamellipodien und nahmen Kontakt mit verschiedenen apoptotischen Neuronen in der Nachbarschaft auf (Mikroglia mit Sternchen). Nach 90 Minuten (12.31) band die Mikroglia ein Neuron mit einem kondensierten Zellkern (Pfeil) und phagozytierte dieses Neuron.

Zunächst mußten sich die Mikrogliazellen auf dem Substrat anheften (Abb.9). Die Mikrogliazellen adherierten dabei auf zellfreien Regionen des Deckglases. Anschließend kam es zur Ausbildung von Lamellipodien, mit denen die Mikrogliazellen Kontakt zu den Neuriten und den Zellkörpern der benachbarten Neurone aufnahmen. Eine Wanderung der Mikroglia fand nicht statt, was darauf hindeutet, daß apoptotische Neurone keine chemoattraktiven Signale produzieren. Die Lamellipodien der Mikroglia interagierten erst mit vielen nicht apoptotischen Neuronen bevor es zur Phagozytose eines apoptotischen Neurons kam. Dies deutet darauf hin, daß wie im peripheren Immunsystem ein direkter Zell-Zell-Kontakt für die Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikroglia notwendig ist. Der eigentliche Prozess der Aufnahme von Neuronen durch die Mikrogliazelle dauerte in diesem Modell normalerweise 15-20 Minuten, wie auch schon für das peripheren Immunsystem beschrieben (Falasca et al., 1996; van den Eijnde et al., 1998).

4.3 Mikrogliazellen binden/phagozytieren apoptotische Zellen

Um die Bindungsmechanismen zwischen apoptotischen Neuronen und Mikrogliazellen zu untersuchen, war es notwendig ein Interaktionsmodell zu entwickeln. Der Zeitraum der Interaktion zwischen apoptotischen Neuronen mit Mikrogliazellen wurde so gewählt, daß eine sekundäre Nekrose der Neurone ausgeschlossen werden konnte.

Wenn auch in allen bisher beschriebenen Arbeiten im peripheren Immunsystem so durchgeführt, war es für die Fragestellung dieser Arbeit nicht sinnvoll, apoptotische Zellen zu adhären Mikrogliazellen zu geben, da das Ablösen der Neurone einen hohen Prozentsatz nekrotischer Zellen induzierte. Vor allem in den Kontrollkulturen konnte durch die mechanische Zerstörung der Neuriten ein nekrotischer Zelltod festgestellt werden (nicht dargestellt). Für das Interaktionsmodell wurden daher die Neurone, die sich auf Deckgläsern befanden, mit 100 μ M SNOC behandelt und nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden Mikrogliazellen in einem Verhältnis von einer Mikrogliazelle zu zehn Neuronen zugegeben. Der Prozentsatz der phagozytierenden Mikroglia wurde nach einer Koinkubationszeit von sechs Stunden ermittelt (für einige Experimente wurde der Prozentsatz bereits nach drei Stunden ermittelt). Hierzu wurden, wie im Methodenteil (3.6) beschrieben, die Mikrogliazellen, die apoptotische Neurone phagozytiert hatten, ausgezählt (Abb.10).

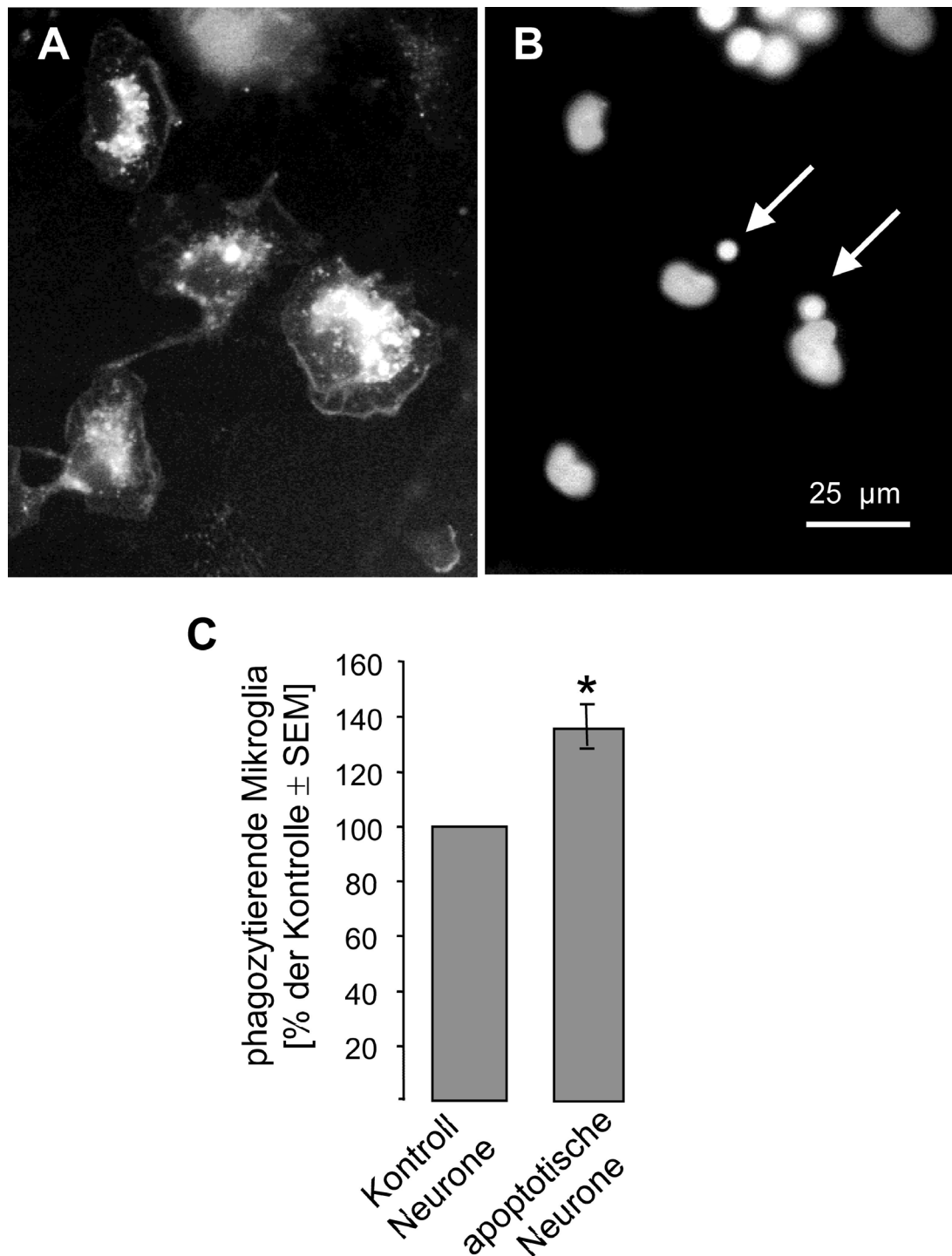


Abbildung 10: Die Bindung/Phagozytose von Neuronen durch Mikrogliazellen nimmt in Kokultur mit SNOC-behandelten Neuronen zu.

A,B: Doppelte Fluoreszenzfärbung von Mikroglia, die apoptotische Neurone phagozytieren. In (A) sind vier Mikrogliazellen gezeigt, die mit ILB4-FITC markiert wurden. Die DAPI Färbung (B) zeigt, daß zwei der Mikrogliazellen ein apoptotisches Neuron, erkennbar am kondensierten Zellkern, gebunden bzw. phagozytiert haben (Pfeile).

C: Der Prozentsatz phagozytierender Mikroglia nimmt nach einer sechstündigen Kokubationszeit in den SNOC behandelten Neuronen-Kulturen auf 134 ± 7.7 % zu. Die Werte sind auf die Kontrolle normiert und als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n = 29). * p < 0,05

Abhängig von den an jeweils unterschiedlichen Tagen präparierten Neuronenkulturen trat eine relativ hohe Phagozytoserate in den unbehandelten Kontrollkulturen auf (Mittelwert $21.3 \pm 1.9 \%$, von 7.4–46.2 %; $n = 29$). Wie unter 4.1.2 beschrieben, können apoptotische Zellen in den unbehandelten Neuronenkulturen festgestellt werden. Da nur Neurone mit kondensiertem Chromatin im Zellkern durch die Mikrogliazellen in den Kontrollkulturen aufgenommen wurden, beruhte die hohe Phagozytoserate in den Kontrollkulturen (Mittelwert $21.3 \pm 1.9 \%$, von 7.4–46.2 %; $n = 29$) auf einer Aufnahme apoptotischer Neurone. In der SNOC-behandelten Kultur nahm der Prozentsatz der Mikroglia, die apoptotische Neurone phagozytiert hatten (Mittelwert $27.2 \pm 2.2 \%$; $n = 29$) im Vergleich zu den Kontrollkulturen zu. In den einzelnen Experimenten wurde eine Phagozytoserate von 50.8 % (von 8.5–50.8 %) nie überschritten. Aufgrund der hohen Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten wurde die Mikroglia Phagozytose in den apoptotischen Kulturen in jedem Experiment auf die Phagozytose in den jeweiligen, nicht mit SNOC behandelten Kontrollkulturen normalisiert. In den apoptotischen Kulturen konnte so eine signifikante Zunahme der Phagozytose auf $134 \pm 7.7 \%$ im Vergleich zu der Phagozytose in den Kontrollkulturen festgestellt werden (Abb.10).

Führte man den Kokulturansatz umgekehrt durch, gab also apoptotische Neurone zu kultivierten Mikrogliazellen, nahm der Prozentsatz phagozytierender Mikroglia deutlich zu ($66 \pm 8.9 \%$) (nicht dargestellt). Dieser experimentelle Ansatz war jedoch, aus den erwähnten Gründen, für die Fragestellung dieser Arbeit nicht sinnvoll.

4.4 Identifikation der Bindungsmechanismen zwischen apoptotischen Neuronen und Mikrogliazellen

Im peripheren Immunsystem spielen drei Erkennungsmechanismen zwischen apoptotischen Zellen und Makrophagen eine bedeutende Rolle:

1. Die Erkennung von veränderten Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen durch Lektine der Phagozyten (siehe 1.4.1.1).
2. Eine Thrombospondin-vermittelte Erkennung von apoptotischen Zellen (siehe 1.4.1.3).
3. Die Erkennung von Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen (siehe 1.4.1.2).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Erkennungsmechanismen ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikroglia spielen.

4.4.1 Spezifische Kohlenhydrate inhibieren die Bindung/Aufnahme von apoptotischen Neurone durch Mikroglia

Monosaccharide, die mit den Lektin-Bindungsstellen interagieren, inhibieren die Aufnahme von apoptotischen Leukozyten durch Makrophagen und semiprofessionellen Phagozyten aus dem peripheren Immunsystem (Savill et al., 1990; Hughes et al., 1997). Um festzustellen, ob derartige Mechanismen auch bei der Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen gelten, wurden die Phagozytoseansätze in Gegenwart von verschiedenen Monosacchariden durchgeführt (Abb.11). Die verwendeten Konzentrationen der Monosaccharide orientieren sich an früheren Studien zur Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen und semiprofessionelle Phagozyten aus dem peripheren Immunsystem (Duvall et al., 1985; Pradhan et al., 1997; Hughes et al., 1997).

Eine signifikante Inhibition der Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikroglia konnte in Gegenwart von 20 mM Galaktose (Gal) beobachtet werden (75.0 ± 7.7 % der Kontrolle = apoptotische Neurone ohne Inhibitoren, $n = 11$). Die Zugabe von 20 mM des Aminozuckers N-Acetylglukosamin (GlcNAc) zeigte eine inhibitorische Tendenz auf die Bindung bzw. Aufnahme apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen (75.8 ± 7.3 %; $n = 9$). N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) ($n = 9$), Glukose (Glu) ($n = 6$), Mannose (Man) ($n = 7$) und Fukose (Fuk) ($n = 6$; 20 mM jeweils) zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die Interaktion zwischen Mikrogliazellen und apoptotischen Neuronen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine Lektinbindung eine Rolle in der Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikroglia spielt.

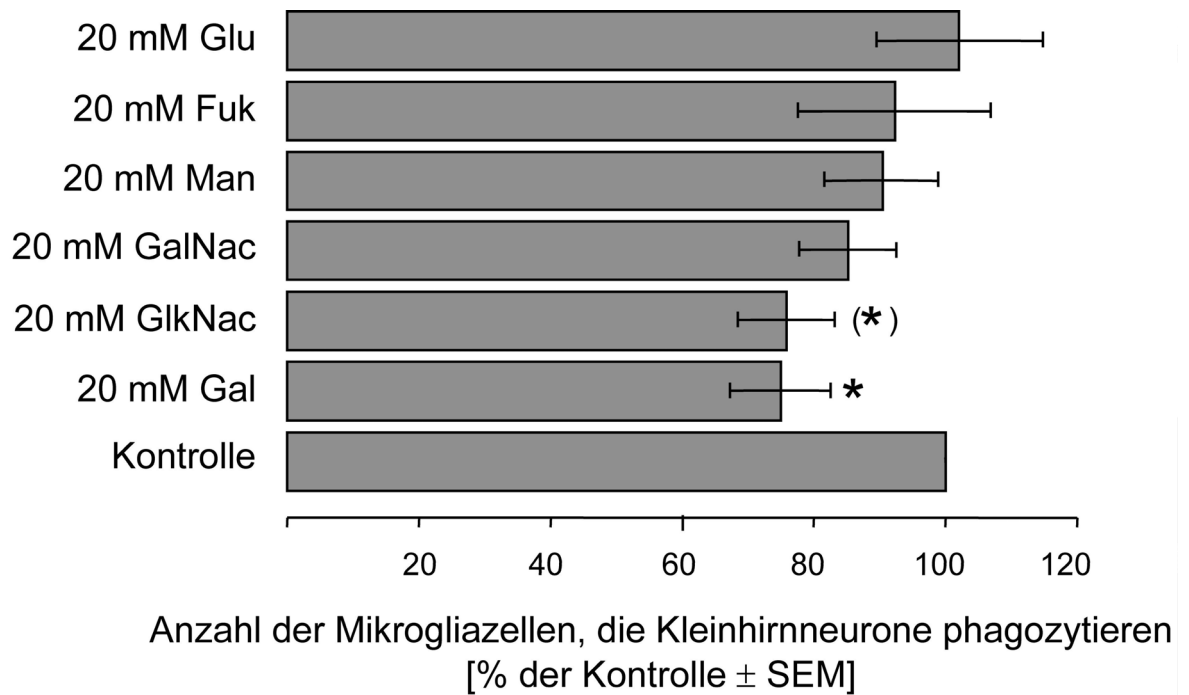


Abbildung 11: Effekt von Monosacchariden auf die Phagozytose apoptotischer Körnerzellen des Kleinhirns durch Mikroglia.

Die Anzahl phagozytischer Mikroglia wurde, wie im Methodenteil beschrieben, sechs Stunden nach Koinkubationszeit der Mikroglia mit den apoptotischen Neuronen ermittelt. Keine Inhibition der Phagozytose war in Gegenwart von Glukose (Glu; n = 6), Fukose (Fuk; n = 6), Mannose (Man; n = 7) oder N-Acetylgalaktosamin (GalNac; n = 9) festzustellen. Eine signifikante Inhibition konnte bei Galaktose beobachtet werden (Gal; n = 11). N-Acetylglukosamin (GlkNac; n = 9) zeigte eine Tendenz zur Inhibition der Phagozytose (*) p = 0.051. Die Werte sind auf die Kontrolle des jeweiligen Experiments normiert und als Mittelwerte der prozentualen Phagozytose der Mikroglia ± SEM dargestellt. Der Schwankungsbereich der phagozytischen Mikroglia in der Kontrolle lag zwischen 8.5 bis 50.8 %. * p < 0,05 versus Kontrollwerte.

4.4.2 RGDS Peptide üben einen inhibitorischen Effekt auf die Erkennung von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen aus

Spezifische inhibitorische Effekte von Arginin-Glycin-Asparagin-Peptiden (RGD Peptide) und kationischen Aminosäuren zeigten, daß ein Thrombospondin-vermittelter Mechanismus bei der Erkennung von apoptotischen Eosinophilen und Lymphozyten durch Makrophagen eine Rolle spielt (Savill et al., 1992; Savill et al., 1993). RGD-Peptide binden an Integrine, wie dem Vitronectinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$), der eine Komponente des Thrombospondin Rezeptors des Phagozyten ist (Savill et al., 1990; Savill et al., 1992). Kationische Aminosäuren verhindern die Bindung von Thrombospondin, da sie anionische Thrombospondin Bindungsstellen auf den apoptotischen Zellen maskieren (Savill et al., 1993). Um festzustellen, ob ein Thrombospondin-vermittelter Mechanismus bei der Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen eine Rolle spielt, wurden die

Phagozytoseansätze in Gegenwart von synthetischen Argenin-Glycin-Asparagin-Serin-Peptiden (RGDS Peptid) oder dem Aminosucker Glukosamin durchgeführt (Abb.12). Zusätzlich wurden synthetische Argenin-Glycin-Glutamin-Serin-Peptide (RGES Peptid) als Kontrollpeptide eingesetzt. RGES-Peptide binden nicht an Integrine und sollten daher auch keinen inhibitorischen Effekt auf die Thrombospondin-vermittelte Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten ausüben. Die angegebenen Konzentrationen der Substanzen orientieren sich an früheren Studien zur Aufnahme apoptotischer Zellen durch semiprofessionelle Phagozyten (Hughes et al., 1997).

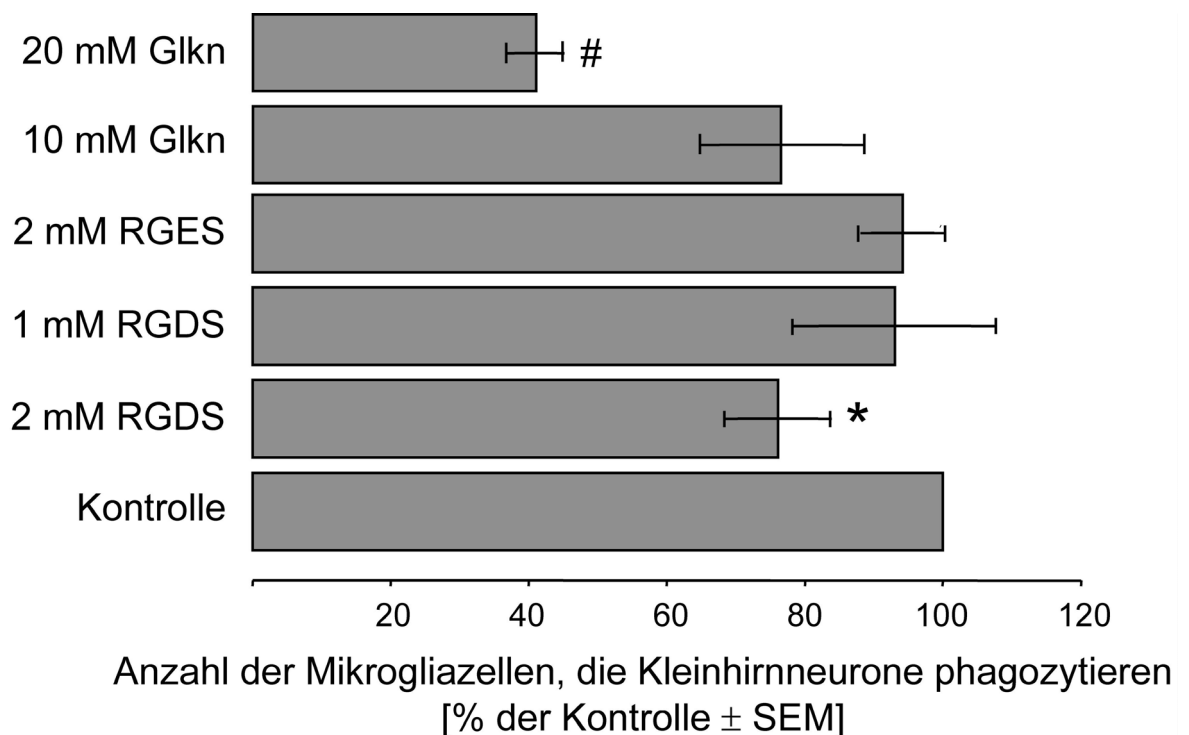


Abbildung 12: RGDS Peptide inhibieren die Phagozytose von apoptotischen Kleinhirneuronen durch Mikroglia.

Die Anzahl phagozytierender Mikrogliazellen wurde sechs Stunden nach Koinkubation der Mikroglia mit apoptotischen Neuronen ermittelt. 10 mM Glukosamin (Glkn) besaß keinen inhibitorischen Effekt auf das Phagozytoseverhalten der Mikrogliazellen. Die Blockierung der Mikroglia Phagozytose durch 20 mM Glukosamin (Glkn; n = 6) war unspezifisch, da 20 mM Glukosamin einen toxischen Effekt auf Mikrogliazellen ausübte (#) (siehe Tabelle1, Seite 51). Ein inhibitorischer Effekt des Kontrollpeptids RGES konnte nicht festgestellt werden (n = 7). Eine signifikante Inhibition konnte für 2 mM RGDS (n = 8) beobachtet werden, jedoch nicht für 1 mM RGDS (n = 6). Die Werte sind auf die Phagozytoserate der Kontrolle des jeweiligen Experiments normiert und als Mittelwerte der prozentualen Phagozytose der Mikroglia ± SEM dargestellt. $p < 0,05$ versus Kontrollwerte.

Mit dem Kontrollpeptid (2 mM RGS) konnte kein inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Durch Zugabe des RGS Peptids in das Interaktionsmedium wurde die Phagozytose apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen signifikant inhibiert. Die Inhibition von RGS war signifikant bei einer Konzentration von 2 mM ($76.1 \pm 7.8 \%$, $n = 8$), konnte jedoch nicht bei einer Konzentration von 1 mM RGS ($n = 6$) beobachtet werden. Dies stimmt mit den inhibitorischen Konzentrationen überein, die auch bei semiprofessionellen Phagozyten beobachtet wurden (Savill et al., 1990; Hughes et al., 1997). Dieser RGS Effekt zeigte eine Zeitabhängigkeit: während eine Inhibition durch 2 mM RGS nach einer dreistündigen Inkubationszeit von Neuronen mit Mikroglia nicht festgestellt werden konnte, war die Inhibition nach einer sechstündigen Inkubationszeit signifikant (nicht dargestellt).

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß eine Bindung von Thrombospondin an Vitronektin Rezeptoren bei der Erkennung apoptotische Neurone durch Mikrogliazellen eine Rolle spielt. Diese Integrin-vermittelte Erkennung ist möglicherweise erst später im apoptotischen Programm wichtig, wie für periphere Makrophagen und semiprofessionelle Phagozyten gezeigt wurde (Pradhan et al., 1997; Hughes et al., 1997).

Die kationischen Aminosäure Glukosamin und Mannosamin üben einen inhibitorischen Effekt auf die Thrombospondin-vermittelte Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen durch semiprofessionelle Phagozyten aus (Hughes et al., 1997). 10 mM Glukosamin (Gln) inhibierte in diesem Interaktionsmodell die Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen nicht signifikant. Durch eine Konzentration von 20 mM Glukosamin, wie sie auch in anderen Phagozytosemodellen verwendet wurde, wurde die Aufnahme von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen geblockt. Diese Blockierung war unspezifisch, da im Neutralrottest gezeigt werden konnte, daß 20 mM Glukosamin einen toxischen Effekt auf Mikroglia ausübte (siehe 4.4.4).

4.4.3 O-Phospho-L-Serin inhibiert die Bindung/Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikroglia

Apoptotische Neurone präsentieren Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite ihrer Plasmamembran (van Engeland et al., 1998). Diese Präsentation von PS auf der Plasmamembran stellt ein Erkennungssignal für Phagozyten dar, wie durch wasserlösliche PS-Analoga, die an die Phosphatidylserinrezeptoren der Phagozyten binden und dadurch

die Erkennung apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen inhibieren, gezeigt werden konnte (Fadok et al., 1992). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die PS-Präsentation durch apoptotische Kleinhirneurone ebenfalls ein Signal zur Erkennung und Phagozytose dieser Zellen durch Mikrogliazellen darstellt.

Hierfür wurde der Phagozytoseassay in Gegenwart von 10 mM O-Phospho-L-Serin (OPS), der wasserlöslichen Kopfgruppe des Phosphatidylserins, durchgeführt.

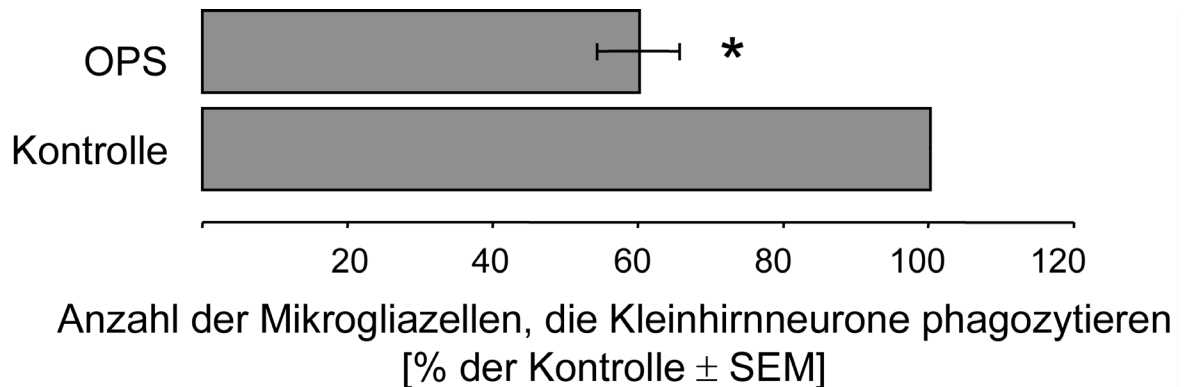


Abbildung 13: Der inhibitorische Effekt von O-Phospho-L-Serin auf die Mikroglia Phagozytose von apoptotischen Kleinhirneuronen.

Die Anzahl phagozytischer Mikrogliazellen wurde sechs Stunden nach Koinkubation der Mikroglia mit apoptotischen Neuronen ermittelt. Eine Inhibition der Phagozytose konnte mit 10 mM O-Phospho-L-Serin (OPS; n = 6) beobachtet werden. Die Werte sind auf die Kontrolle des jeweiligen Experiments normiert und als Mittelwerte der prozentualen Phagozytose der Mikroglia \pm SEM dargestellt. Die Anzahl der phagozytischen Mikroglia in der Kontrolle lag zwischen 8.5 und 50.8 %. $p < 0,05$ versus Kontrollwerte.

Die Anzahl der Mikroglia, die apoptotische Neurone phagozytierten, wurde durch die Anwesenheit von OPS im Interaktionsmedium im Vergleich zu der Kontrolle ohne Inhibitoren im Interaktionsmedium signifikant verringert (60.0 ± 5.6 %; n = 6) (Abb.13). Dies weist darauf hin, daß es durch OPS zu einer Blockierung der PS-Rezeptoren kommt, wodurch ein Teil der apoptotischen Neurone nicht mehr von Mikrogliazellen erkannt werden konnte.

4.4.4 Vitalitätstest mit Neutralrot in Gegenwart der verwendeten inhibitorischen Substanzen

Eine mögliche inhibitorische Wirkung der eingesetzten Substanzen auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Mikrogliazellen könnte auf eine unspezifische toxische Wirkung der Substanzen auf Mikroglia beruhen. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe eines Vitalitätstest mit Neutralrot (NR) untersucht, ob die eingesetzten Substanzen einen unspezifischen, toxischen Effekt auf Mikrogliazellen ausübten (siehe Methodenteil 3.8). NR wird durch die sogenannte „fluid phase“ Endozytose von den Zellen aufgenommen (Konopski et al., 1995). Endozytose ist die vesikuläre Aufnahme von Flüssigkeit, Makromolekülen oder Partikeln in (*endo*) die Zelle (*cyto*).

Konzentrationen der phagozytotisch inhibitorischen Substanzen	Abs.540 nm (Mittelwert in % der Kontrolle \pm SEM)
20 mM Glukose	96.7 \pm 2.5
20 mM Fukose	98.7 \pm 3.4
20 mM Mannose	96.3 \pm 2.4
20 mM Galaktose	100.6 \pm 3.3
20 mM N-Acetylglukosamin	95.5 \pm 1.3
20 mM N-Acetylgalaktosamin	95.6 \pm 3.0
10 mM O-Phospho-L-Serin	96.7 \pm 2.4
20 mM O-Phospho-L-Serin	97.0 \pm 2.2
10 mM Glukosamin	94.2 \pm 4.1
20 mM Glukosamin	77.2 (n = 1) †
10 mM Mannosamin	61.4 \pm 13.3 †
20 mM Mannosamin	55.2 (n = 1) †
Fixierte Zellen	61.7 (n = 1)

Tabelle 1: Neutralrot Test zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Mikroglia in der Anwesenheit der löslichen Inhibitoren.

Die Endozytose von Neutralrot wird mit Ausnahme von Glukosamin und Mannosamin nicht durch die löslichen Inhibitoren beeinflusst. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in % der Kontrolle \pm SEM von fünf Experimenten ausgedrückt. In jedem einzelnen Experiment wurde jede Substanz in sechs parallelen Ansätzen getestet. Die Kontrollwerte entsprechen Mikrogliazellen, die unter gleichen Bedingungen ohne jegliche Testsubstanz inkubiert wurden. Mit 2 % Paraformaldehyd fixierte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet.

Die Konzentrationen der verwendeten Peptide, OPS und der meisten Monosaccharide wirkten nicht toxisch auf Mikrogliazellen (Tabelle 1). 20 mM Glukosamin, 10 mM und 20 mM Mannosamin, die in anderen Phagozytosemodellen einen inhibitorischen Effekt ausübten (Hughes et al., 1997), zeigten hingegen in diesem Modell eine toxische Wirkung.

4.5 Charakterisierung der Phosphatidylserinbindung

Aufgrund des starken inhibitorischen Effekts durch OPS auf die Aufnahme von apoptotischen Kleinhirneurone durch Mikrogliazellen ist eine Erkennung von PS auf der Außenseite der Plasmamembran von apoptotischen Kleinhirneuronen ein bedeutender Mechanismus, durch den diese apoptotischen Zellen durch Mikrogliazellen erkannt und phagozytiert werden. Daher wurden Versuche durchgeführt, die den Mechanismus der Phosphatidylserinbindung durch Mikrogliazellen näher charakterisieren sollten. Zu diesem Zweck wurden Lipidvesikel („large unilamellated vesicles“ (LUVs)), die unterschiedliche Konzentrationen (10 %, 1 % und 0,1 %) von PS (PS-LUVs) enthielten, als ein apoptotisches Zellmodell verwendet. Lipidvesikel, die nur aus Phosphatidylcholin (PC-LUVs) bestanden, dienten als Modell für normale, nicht apoptotische Zellen. Zur Detektion der PS- und PC-LUVs enthielten diese 1 mol% Rhodamin-konjugiertes Phosphatidylethanolamin.

4.5.1 Spezifische Erkennung von Phosphatidylserin durch Mikroglia

Die Natur des Phosphatidylserin Rezeptors, der zur Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Phagozyten führt, ist noch ungeklärt (Fadok et al., 1998). Mögliche Kandidaten könnten Scavenger Rezeptoren oder der LPS-Rezeptor CD14 darstellen (Fadok et al., 1998). Beide Rezeptortypen werden von Mikrogliazellen exprimiert (Becher et al., 1996; Paresce et al., 1996). Da einige Phagozyten PS exprimierende Zellen binden ohne sie zu phagozytieren, scheint die Phagozytose von PS exprimierenden Zellen durch Phagozyten noch von weiteren Faktoren abhängig zu sein (Savill 1997). Mit Hilfe der Lipidvesikel sollte untersucht werden, ob Mikrogliazellen Rezeptoren exprimieren, die spezifisch PS erkennen und ob diese Erkennung zu einer Phagozytose der Lipidvesikel führt.

Zu diesem Zweck wurden Mikrogliazellen mit den jeweiligen Lipidvesikeln (PS-LUVs bzw. PC-LUVs) für eine Stunde inkubiert (siehe Methoden 3.9).

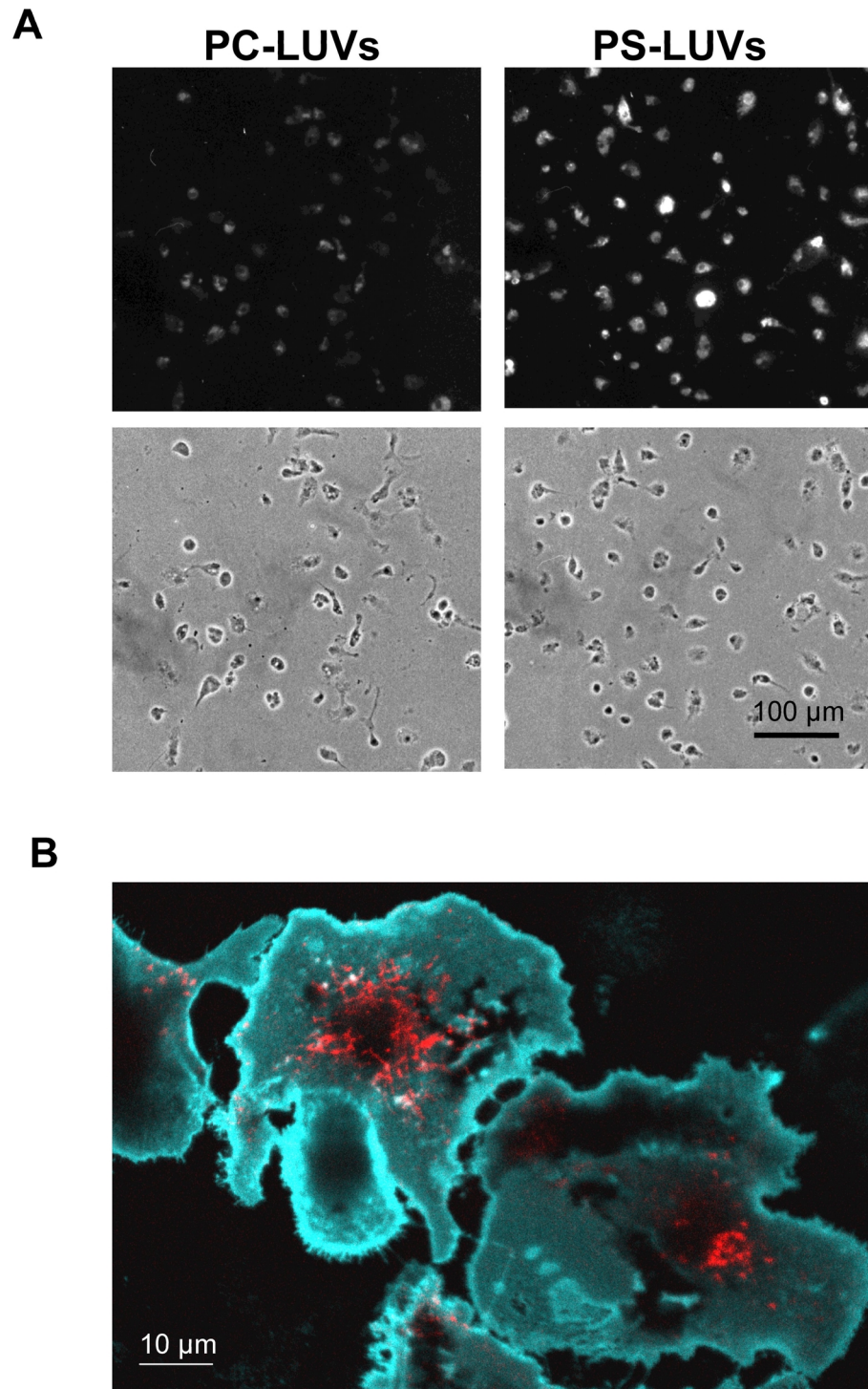


Abbildung 14: Mikrogliazellen binden und phagozytieren Lipidvesikel, die Phosphatidylserin enthalten.

A: Mikrogliazellen wurden mit Rhodamin markierten LUVs für 60 Minuten inkubiert. LUVs mit 10 mol% Phosphatidylserin wurden von Mikrogliazellen gebunden (rechte obere Abbildung). Kulturen inkubiert mit PC-Kontroll-Vesikeln (kein Phosphatidylserin) zeigen eine geringe unspezifische Bindung (linke obere Abbildung). In den unteren Abbildungen sind die entsprechenden Phasenkontrastbilder zu den oberen Fluoreszenzbildern dargestellt. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Versuch aus fünf unabhängigen Versuchen.

B: Konfokale Aufnahme einer Mikrogliazelle, die mit IL-B₄-FITC (grün) angefärbt wurde. Die Rhodamin markierten PS-LUVs (rot) befinden sich im Cytoplasma der Mikroglia.

PS-LUVs wurden von den Mikrogliazellen stark gebunden und, wie durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen werden konnte, auch phagozytiert (Abb.14). PC-LUVs wurden nur schwach von den Mikrogliazellen gebunden (Abb.14). Mikrogliazellen exprimieren daher einen Rezeptor, der PS binden kann. Damit konnte auch ausgeschlossen werden, daß das zur Fluoreszenzdetektion in den LUVs eingebaute Rhodamin konjugierte Phosphatidylethanolamin die Bindung der LUVs an die Mikrogliazelle beeinflusste.

4.5.2 Spezifische Erkennung von Phosphatidylserin durch Astrozyten

Nicht nur professionelle Phagozyten, wie Makrophagen und Mikroglia sondern auch semiprofessionelle Phagozyten, wie Hepatozyten, sind in der Lage, apoptotische Zellen zu erkennen und zu phagozytieren (Dini et al., 1992). Auch für Astrozyten wurde eine phagozytotische Aktivität beschrieben (Bechmann und Nitsch, 1997). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Astrozyten oder Oligodendrozyten selektiv PS-LUVs erkennen. Hierzu wurden Gliamischkulturen, in denen sich neben Mikrogliazellen auch Astrozyten und Oligodendrozyten befanden, mit Lipidvesikeln inkubiert (siehe Methoden 3.9).

Eine deutlich stärkere Bindung der PS-LUVs, im Gegensatz zu den PC-LUVs, konnte ebenfalls bei kultivierten Astrozyten festgestellt werden (Abb.15). Dies deutet darauf hin, daß Astrozyten als semiprofessionelle Phagozyten in der Lage sind, apoptotische Zellen zu erkennen. Oligodendrozyten hingegen zeigten keine Bindung der PS-LUVs (Abb. 15)

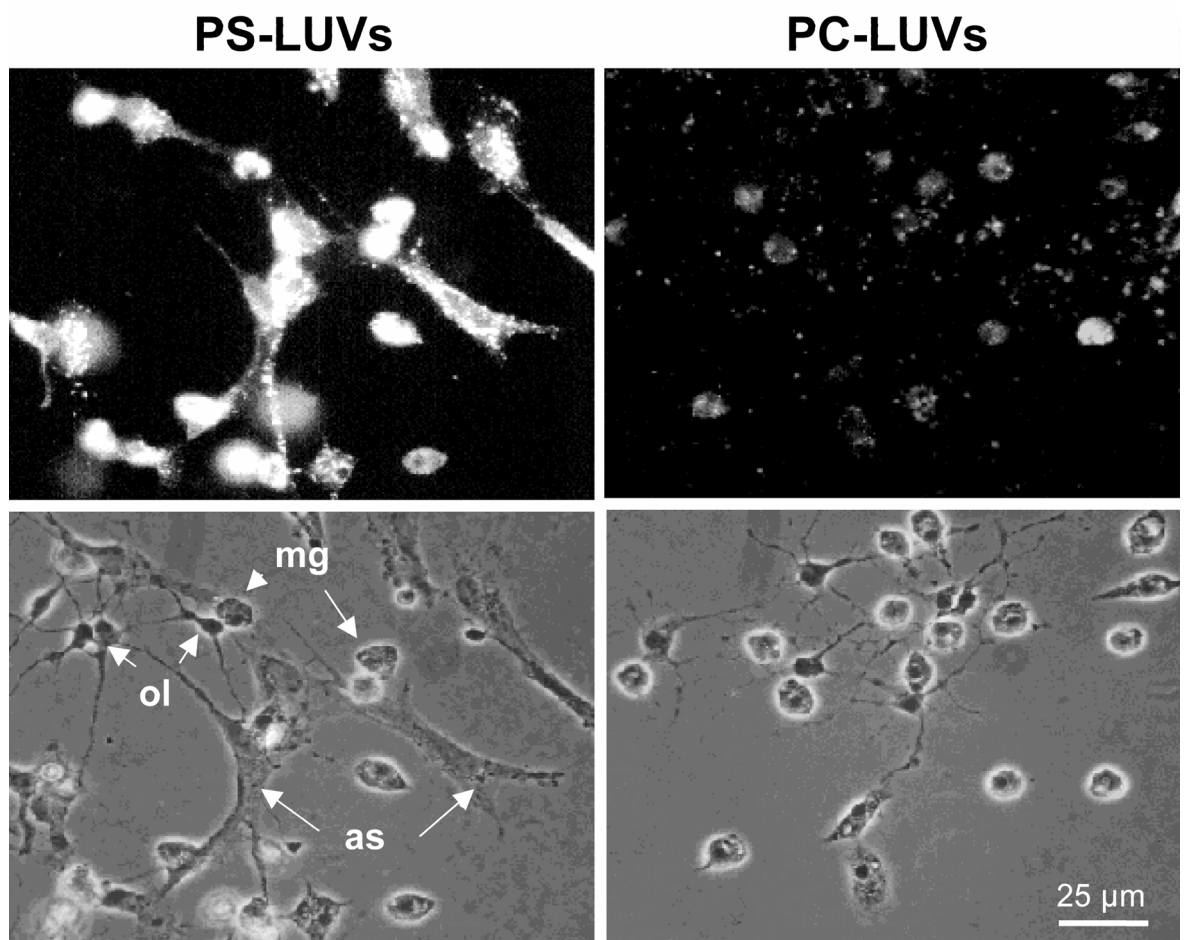


Abbildung 15: Bindung von PS-LUVs durch Astrozyten:

Gliakulturen die sowohl Mikrogliazellen (mg), Astrozyten (as) als auch Oligodendrozyten (ol) enthielten, wurden mit Rhodamin markierten LUVs für 60 Minuten inkubiert. LUVs mit 10 mol% Phosphatidylserin wurden stark durch Mikrogliazellen gebunden (linke Abbildung). Astrozyten (as) wurden ebenfalls markiert, während Oligodendrozyten (ol) unmarkiert blieben. Kulturen inkubiert mit PC-LUVs zeigten eine schwache unspezifische Bindung (rechte Abbildung). Die unteren Abbildungen stellen die entsprechenden Phasenkontrastbilder zu den oberen Fluoreszenzbildern dar. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Versuch aus zwei unabhängigen Versuchen.

4.5.3 Zeitabhängigkeit der Bindung von Phosphatidylserin-LUVs durch Mikrogliazellen

Apoptotische Zellen werden im Gewebe schnell durch Phagozyten erkannt (Savill 1997). Zur Untersuchung der Frage, wie schnell es zu einer Bindung von PS-LUVs durch den PS-Rezeptor der Mikrogliazelle kommt, wurden Mikrogliazellen unterschiedlich lange mit den Lipidvesikeln inkubiert (siehe Methodenteil 3.9).

5 min

30 min

Abbildung 16: Zeitabhängige Bindung der Phosphatidylserin-LUVs an Mikrogliazellen.

Mikrogliazellen wurden zeitabhängig mit Rhodamin markierten PS-LUVs, die 10 mol% PS enthielten, inkubiert. Bereits nach fünf Minuten Inkubationszeit der Mikrogliazellen mit PS-LUVs konnte eine Bindung der LUVs beobachtet werden. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit der Mikrogliazellen mit PS-LUVs konnte eine Fluoreszenz in den Vesikeln der Mikroglia beobachtet werden. Nach 30 und 60 Minuten war eine deutliche Akkumulation der Fluoreszenz in den Mikrogliazellen festzustellen. Die Abbildungen zeigen einen Versuch aus drei unabhängigen Versuchen.

Die PS-LUVs wurden bereits nach fünf Minuten schwach von den Mikrogliazellen gebunden. Die Fluoreszenz war jedoch scheinbar hauptsächlich auf die Oberfläche der Mikrogliazelle beschränkt. Die Bindung der LUVs erfolgte daher sehr schnell. Bereits nach einer 15 minütigen Inkubationszeit befand sich die Fluoreszenz der LUVs auch im Zytoplasma der Mikrogliazelle, was auf eine Phagozytose der LUVs hindeutet (Abb.16). Innerhalb der nächsten 30–60 Minuten kam es zu einer weiteren Akkumulation von fluoreszierenden Partikeln im Zytoplasma.

4.5.4 Konzentrationsabhängige Bindung der Phosphatidylserin-LUVs an die Mikroglia

Da Lipidmoleküle spontan zwischen der inneren und der äußeren Seite der Plasmamembran wechseln können (flip-flop), kommen geringe Konzentrationen von PS wahrscheinlich auch unter normalen, nicht apoptotischen Bedingungen auf der extrazellulären Seite der Zytoplasmamembran vor (van Meer et al., 1981; Roelofsen und Op den Kamp, 1994). Die Erkennung von Phosphatidylserin sollte daher von der Konzentration des exponierten Phosphatidylserins abhängig sein. Um diese mögliche untere Schwellenkonzentration von Phosphatidylserin in Membranen zu bestimmen, die für eine spezifische Erkennung durch Mikroglia notwendig ist, wurden Lipidvesikel mit unterschiedlichen Konzentrationen von PS (10, 1 oder 0,1 mol% PS) mit Mikrogliazellen inkubiert (siehe Methodenteil 3.9).

Zwischen PS-LUVs die 1 mol% und 10 mol% Phosphatidylserin enthielten, konnte kein Unterschied in der Fluoreszenz festgestellt werden (Abb.17). Vesikel mit 0.1 mol% PS

hingegen konnten nur schwach detektiert werden, das heißt die PS-LUVs wurden von der Mikrogliazelle gering gebunden. Diese Mikroglia assoziierte Fluoreszenz entsprach der Kontrolle (PC-LUVs) (Abb.17). Eine spezifische Erkennung und Bindung von Phosphatidylserin durch Mikrogliazellen dürfte daher bei etwa 1 mol% Phosphatidylserin liegen. Dies korrespondiert mit Beobachtungen an seneszenten Erythrozyten, deren PS-Konzentration auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran bei 0,6 mol% liegt (Roelofsen und Op den Kamp, 1994)

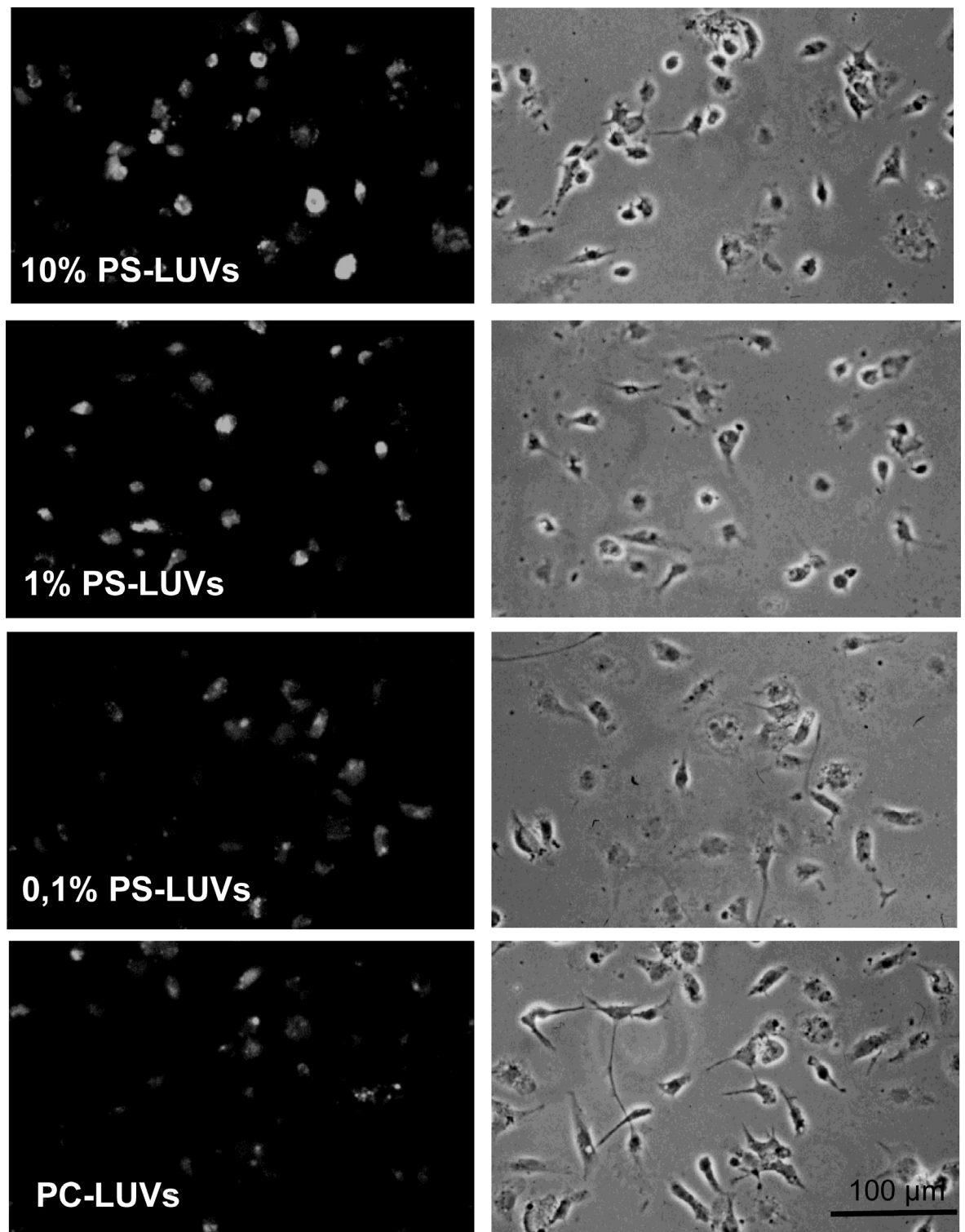


Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit der Phosphatidylserinbindung.

Mikroglia kulturen wurden mit Rhodamin markierten LUVs, die unterschiedliche Konzentrationen von Phosphatidylserin enthielten, für 60 Minuten inkubiert. Auf der linken Seite sind die Fluoreszenzaufnahmen dargestellt, auf der rechten Seite die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Eine Inkubation der Mikroglia mit 10 mol% PS-LUVs oder 1 mol% PS-LUVs führte zu einer spezifischen Färbung der Mikrogliazellen, während eine Inkubation der Mikroglia mit 0.1 mol% PS-LUVs nicht von einer Inkubation mit den Kontroll-Vesikeln (PC-LUVs) zu unterscheiden war. Die Abbildungsserie zeigt einen repräsentativen Versuch aus drei unabhängigen Versuchen.

4.5.5 Die Bindung der Phosphatidylserin-LUVs ist unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikroglia

Der bevorzugte Bindungsmechanismus zwischen apoptotischen Zellen und Makrophagen hängt auch vom Aktivierungszustand der Makrophagenzelle ab (Ren und Savill, 1995). Mikrogliazellen kommen im Gewebe in unterschiedlichen Aktivierungszuständen, die auch mit morphologischen Veränderung der Mikrogliazellen verbunden sind, vor (siehe Einleitung 1.3). Durch den Prozess der Kultivierung werden Mikrogliazellen aktiviert und liegen als amöboide Zellen vor. Durch die Behandlung mit astrozytenkonditioniertem Medium bilden kultivierte Mikrogliazellen der Maus eine ramifizierte Morphologie aus (Eder et al., 1999). Eine Behandlung der kultivierten Mikrogliazellen mit Lipopolysaccharid (LPS) führt zu einer verstärkten Aktivierung dieser Zellen, was mit einer Zunahme der phagozytotischen Aktivität verbunden ist (abd-el Basset und Fedoroff, 1995).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Mikrogliazellen unabhängig vom Aktivierungszustand einen PS-Rezeptor exprimieren. Diese Versuche wurden mit Mikrogliazellen aus der Maus durchgeführt, da eine ramifizierte Morphologie der Mikrogliazellen in Kultur mit Hilfe von astrozytenkonditioniertem Medium nur im Maussystem erreicht werden kann. Zunächst wurde bestätigt, daß PS-LUVs deutlich stärker als PC-LUVs auch von Mikrogliazellen der Maus gebunden wurden (nicht dargestellt). Dann wurden unbehandelte Mikrogliazellen der Maus, LPS behandelte Mikrogliazellen (100 ng/ml LPS für 24 Stunden) und Mikrogliazellen die mit astrozytenkonditioniertem Medium kultiviert wurden, für eine Stunde mit PS-LUVs inkubiert.

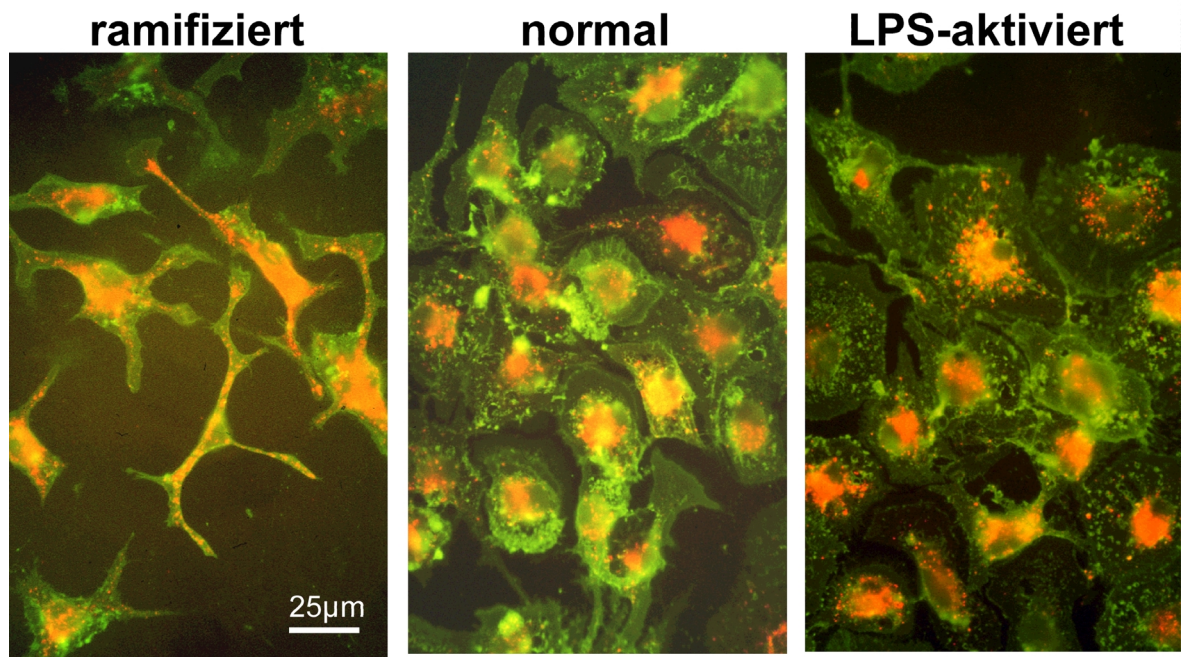


Abbildung 18: Die Bindung der PS-LUVs ist unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikrogliazellen.

Mikrogliazellen wurden für eine Stunde mit PS-LUVs inkubiert. Ramifizierte Mikrogliazellen wurden mit astrozytenkonditioniertem Medium kultiviert. Aktivierte Mikrogliazellen wurden für 24 Stunden mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Eine Bindung/Aufnahme von PS-LUVs konnte in allen unterschiedlich Kultursystemen beobachtet werden.

Eine Bindung der PS-LUVs konnte in allen Kultivierungsansätzen festgestellt werden (Abb.18). Die Rezeptoren für Phosphatidylserin sind also in jedem Aktivierungszustand der Mikrogliazelle in Kultur vorhanden.

4.6 Die Bindung und Phagozytose von Phosphatidylserin-LUVs ist nicht mit einer Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen durch Mikrogliazellen verbunden

Da es im Verlauf der Phagozytose von apoptotischen Zellen nicht zu einer Aktivierung der Phagozyten kommt, wird ein apoptotischer Zelltod nicht von einem inflammatorischen Prozess begleitet (Fadok et al., 1998). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Mikrogliazellen ebenfalls durch eine ausbleibende Aktivierung der Mikroglia gekennzeichnet ist. Als Modellsystem für apoptotische Zellen wurden PS-LUVs verwendet. Als Aktivierungsmarker wurde die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 und IL-12 und

Chemokinen, wie KC und MIP-1 α durch die Mikrogliazellen untersucht. Diese Untersuchungen wurden an Mikrogliazellen der Maus durchgeführt, da entsprechende ELISAs im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Kettenmann etabliert waren und die entsprechenden Zytokin-Tests für das Rattensystem nicht alle kommerziell erhältlich waren. Mikrogliazellen wurden über Nacht mit den Lipidvesikeln inkubiert und anschließend der Überstand auf die oben genannten Zytokine oder Chemokine hin untersucht (siehe Methodenteil 3.10). Als Positivkontrolle dienten Überstände von Mikrogliazellen, die mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden.

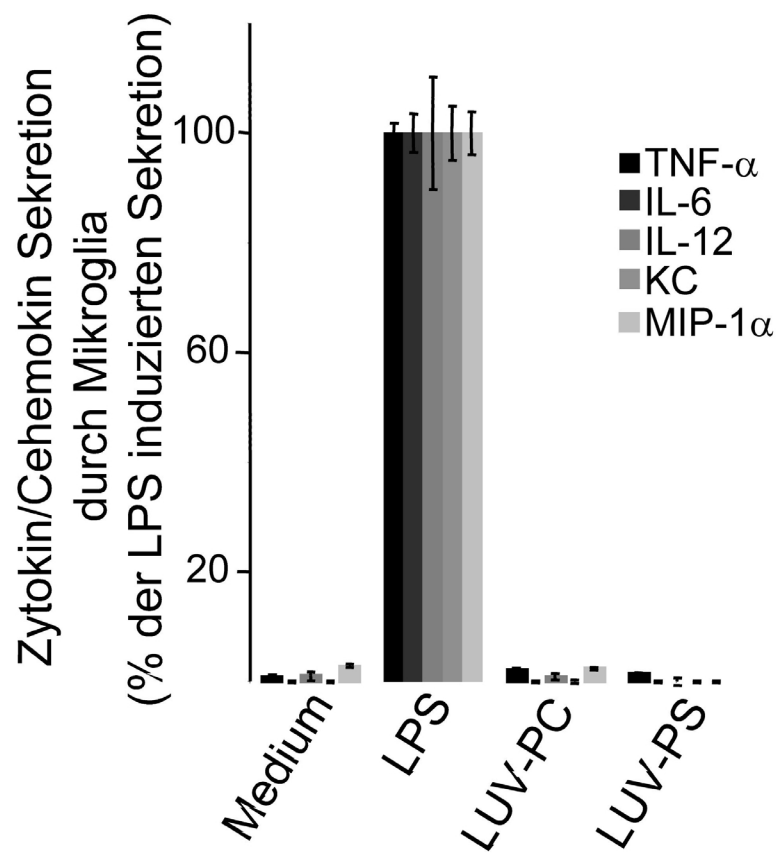


Abbildung 19: Eine Inkubation der Mikrogliazellen mit Lipidvesikeln führt nicht zu einer Stimulation der Zytokin/Chemokin- Sekretion

Der Gehalt von Zytokinen und Chemokinen im Überstand von Mikrogliazellen, die über Nacht mit LPS, PC-LUVs oder PS-LUVs inkubiert wurden, konnten mit Hilfe spezifischer ELISAs ermittelt werden. Für TNF- α , IL-12 und KC wurden 20 Werte in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt. Für IL-12 und MIP-1 α wurden 12 Werte ermittelt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt als % der Zytokin bzw. Chemokin Ausschüttung durch Mikroglia nach einer LPS-Behandlung.

Weder die Inkubation der Mikrogliazellen mit PS-LUVs, noch die Inkubation mit PC-LUVs führte zu einer erhöhten Zytokin- oder Chemokin Sekretion im Vergleich zu unbehandelten Mikrogliazellen (Abb.19). LPS hingegen führte eindeutig zu einer Freisetzung aller untersuchten Faktoren. Eine Erkennung von Phosphatidylserin durch Mikrogliazellen führt daher nicht zu einer Aktivierung dieser Zellen im Sinne einer erhöhten sekretorischen Aktivität.

4.7 Induktion einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Mikrogliazellen durch Phosphatidylserin-LUVs

Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und apoptotischen Zellen induziert eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums, ein Prozess, an dem der Vitronektin Rezeptor beteiligt ist (Rubartelli et al., 1997). Mit Hilfe von Kalziumchelatoren konnte gezeigt werden, daß dieses Kalziumsignal für die Phagozytose der apoptotischen Zellen durch dendritischen Zellen notwendig ist, während Makrophagen keine Mobilisierung des intrazellulären Kalziums benötigen (Rubartelli et al., 1997). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen apoptotischen Zellen und Mikrogliazellen ebenfalls mit einem Kalziumsignal verbunden ist. Als apoptotisches Modellsystem wurden PS enthaltende Lipidvesikel verwendet.

Die Lipidvesikel wurden in einer Konzentration von 100 μ M lokal in der Nähe von Mikrogliazellen mit einer Glasmikropipette appliziert und der Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet (siehe Methodenteil 3.11). Eine Erhöhung des Verhältnisses der Fluoreszenz von 340 nm zu 380 nm um 2/3 des Ausgangswertes wurde als Kalziumsignal gewertet. Die Lipidvesikel wurden an zwei, zu unterschiedlichen Zeitpunkten präparierten Mikrogliazellkulturen mit jeweils mindestens 60 Zellen getestet.

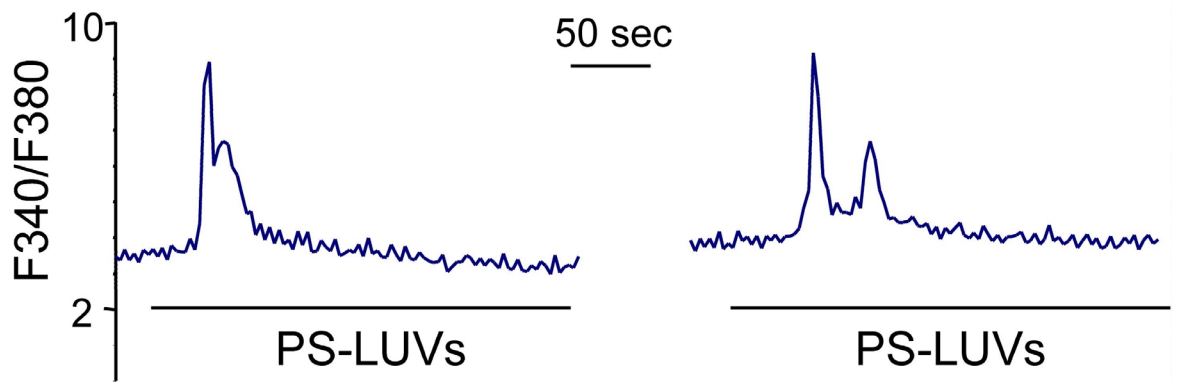


Abbildung 20: Die Bindung von PS-LUVs induziert Kalziumsignale in Mikrogliazellen.

Die Abbildung zeigt zwei typische, durch Applikation von 100 μ M PS-LUVs ausgelöste, intrazelluläre Kalziumsignale. Die Kalziumsignale zeigen einen schnellen Anstieg, der wieder auf den Ruhewert absinkt. Rechts ist die Reaktion einer Mikrogliazelle mit zwei peakförmigen Antworten dargestellt, die Zelle links zeigt nach einer peakförmigen Antwort noch eine Plateauphase.

Exemplarisch sind zwei durch die Applikation von PS-LUVs (5 μ l) ausgelösten Kalziumsignale in Abbildung 20 dargestellt. Der Verlauf des intrazellulären Kalziumsignals zeigt in der Regel zunächst einen schnellen Anstieg bis zu einem Maximalwert und sinkt dann, nach einer kurzen Plateauphase, schnell wieder auf den Ruhewert ab (Abb.20). In einigen Mikrogliazellen konnten auch mehrere Antworten beobachtet werden (Abb.20).

Eine Applikation von PS-LUVs führte, im Gegensatz zu einer Applikation von PC-LUVs ($9,7 \% \pm 6,9 \%$) in $66,5 \% \pm 20,0 \%$ der Mikrogliazellen zur Induktion eines Kalziumsignals (Abb.21). Um Applikations-Artefakte auszuschließen, wurde HEPES-Puffer appliziert. Dies führte nur in wenigen Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($8,5 \pm 9,0 \%$). Dieser durch HEPES-Puffer ausgelöste Prozentsatz von Mikrogliazellen mit einem Kalziumsignal lag in dem Bereich, in dem auch Mikroglia mit spontanen Kalziumsignalen beobachtet wurden ($23,7 \% \pm 21,7 \%$). Eine Bindung von PS durch Mikroglia führt daher, wie bei der Aufnahme apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen, zu einem intrazellulären Kalziumsignal in der Mikrogliazelle. Die Applikationsmethode selbst führte nicht zur Auslösung von Kalziumsignalen in Mikrogliazellen.

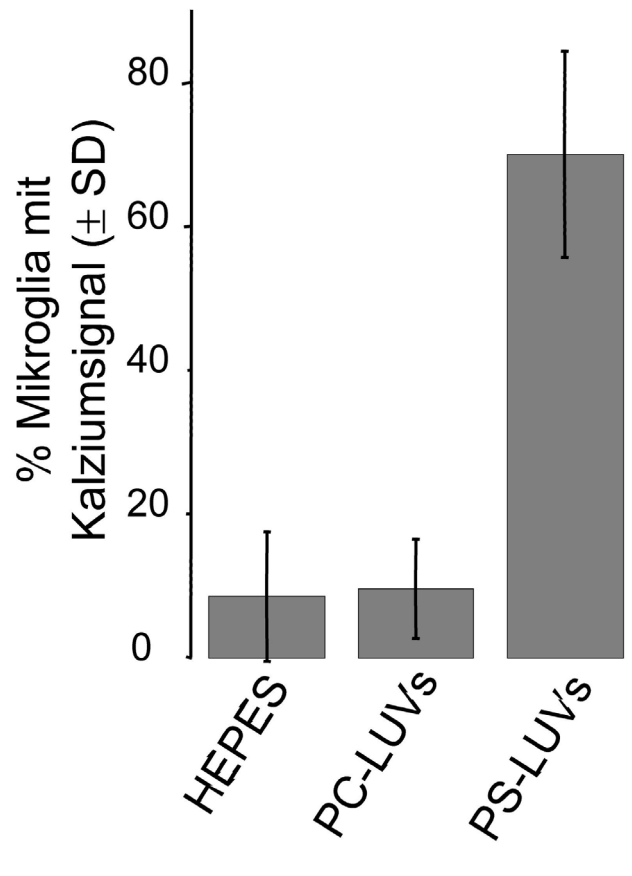


Abbildung 21: PS-LUVs induzieren ein Kalziumsignal in Mikrogliazellen

Eine Applikation von PS-LUVs führte in den Mikrogliazellen im Gegensatz zu einer Applikation von PC-LUVs oder HEPES-Puffer zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Kalziumantworten in den Mikrogliazellen in Prozent \pm SD.

5 Diskussion

Der apoptotische Zelltod ist ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung des Nervensystems und tritt unter nahezu allen pathologischen Situationen im ZNS auf (Oppenheim, 1997; Nicotera und Lipton, 1999). Die schnelle Entfernung apoptotischer Zellen aus dem Gewebe durch Phagozyten ist ein wichtiges begleitendes Phänomen des apoptotischen Zelltods *in vivo* (Waters 1996). Da die Mikrogliazellen die professionellen Phagozyten des zentralen Nervensystems darstellen, sind sie an der Entfernung von apoptotischen Zellen aus dem Gewebe beteiligt. Über die Interaktion von Mikrogliazellen und apoptotischen Zellen des zentralen Nervensystems ist bisher wenig bekannt. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit die Mechanismen untersucht, die zu einer Erkennung, Bindung und Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen führen. Die durchgeführten Versuche weisen darauf hin, daß die Erkennung von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran von apoptotischen Neuronen die bedeutendste Rolle bei der Aufnahme dieser Zellen durch Mikroglia spielt. Daher wurden weitere Untersuchungen mit Hilfe eines vereinfachten Modellsystems für apoptotische Zellen in Form von Lipidvesikeln, die Phosphatidylserin (PS) enthielten, durchgeführt. Hierbei wurde die Bindung PS-haltiger Lipidvesikel an Mikrogliazellen, Astrozyten und Oligodendrozyten untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob die Bindung und/oder Phagozytose der Lipidvesikel, als Modellsystem für apoptotische Zellen, zu einem Kalziumsignal oder zu einer sekretorischen Aktivierung der Mikrogliazellen führt.

5.1 Stickstoffmonoxid induziert einen apoptotischen Zelltod in kultivierten Kleinhirnneuronen der Ratte

Zur Untersuchung der Bindungsmechanismen zwischen apoptotischen Zellen des zentralen Nervensystems und Mikrogliazellen war es notwendig, ein geeignetes neuronales Zellmodell zu etablieren, in dem ein apoptotischer Zelltod ausgelöst werden konnte. In dem hier gewählten apoptotischen Zellmodell wurden Kleinhirnneurone verwendet, da in diesen Kulturen die Auslösung eines apoptotischen Zelltods bereits charakterisiert war (Leist et al., 1997; Chang und Wang, 1997). Ein apoptotischer Zelltod kann in den Kleinhirnneuronen durch Austausch des Kulturmediums mit hohen, depolarisierenden Kaliumkonzentrationen (25 mM) gegen Kulturmedium mit niedrigen

Kaliumkonzentrationen (5 mM) ausgelöst werden (Chang und Wang, 1997). Die Auslösung des apoptotischen Zelltods in Neuronen durch Verringerung der Kaliumkonzentration repräsentiert ein Modell zur Untersuchung von entwicklungsbedingtem Zelltod. *In vivo* erfolgt die Depolarisation der Neurone durch innervierende, afferente Neurone, die das Überleben der Neurone in der Entwicklung des Nervensystems ermöglichen (Burek und Oppenheim, 1996). Daher ist die durch hohe Kaliumkonzentrationen hervorgerufene Depolarisation für das Überleben der Neurone in Kultur wichtig (Chang und Wang, 1997). Durch einen Wechsel des Mediums zu niedrigen Kaliumkonzentrationen kommt es nicht mehr zu einer ständigen Depolarisation der Neurone, wodurch ein apoptotischer Zelltod ausgelöst wird.

Eine weitere Methode zur Induktion eines apoptotischen Zelltods in den Kleinhirnneuronen besteht in der Inkubation der Neurone mit einem Stickstoffmonoxid (NO)-Donator (Leist et al., 1997). Stickstoffmonoxid (NO) ist ein physiologischer Botenstoff im zentralen Nervensystem, kann aber in hohen Konzentrationen eine toxische Wirkung ausüben (Leist und Nicotera, 1997). Unter physiologischen Bedingungen reguliert NO unter anderem die Durchblutung und übt einen Einfluß auf die neuronale Weiterleitung von Signalen aus, indem NO die Neurotransmitterausschüttung an den Präsynapsen von Neuronen stimuliert (Leist et al., 1997; Lipton und Nicotera, 1998). Unter pathologischen Bedingungen werden hohe Konzentration von NO, welches unter anderem von aktivierten Mikrogliazellen freigesetzt werden kann, im Gewebe festgestellt (Bonfoco et al., 1995). Die toxische Wirkung von NO basiert auf der Schädigung der DNA und irreversiblen Proteinmodifikationen, wie der S-Nitrosylierung (Leist und Nicotera, 1998). Durch die Zugabe von NO-Donatoren, wie S-Nitrosocystein, zu Neuronenkulturen kommt es zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) (Leist et al., 1997). Peroxynitrit wird durch die Reaktion von NO^\cdot mit Sauerstoffsuperoxid (O_2^\cdot) gebildet und führt ebenfalls zu DNA Schäden und irreversiblen Proteinmodifikationen (Leist et al., 1997). Durch Peroxynitrit, das unter pathologischen Bedingungen wie Ischämie auftritt, kann ein apoptotischer Zelltod in kortikalen Neuronen ausgelöst werden (Bonfoco et al., 1995). Der durch geringe Konzentrationen von NO oder Peroxynitrit ausgelöste apoptotische Zelltod in Kleinhirnneuronen kann durch NMDA Rezeptor Blocker verhindert werden (Leist und Nicotera, 1998). Dieser toxische Effekt von NO auf Kleinhirnneurone könnte auf eine verstärkte Neurotransmitter Ausschüttung an den Präsynapsen der Neurone zurückzuführen sein (Leist et al., 1997). Dadurch kommt es zu einer ständigen und starken

Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Eine ständige und/oder starke Aktivierung von Glutamatrezeptoren ist ein Merkmal vieler inflammatorischer Erkrankungen des Nervensystems (siehe Einleitung 1.2). Die Auslösung des apoptotischen Zelltods durch NO-Donatoren in Kleinhirnneuronen repräsentiert daher ein Modell zur Untersuchung des pathophysiologischen apoptotischen Zelltods.

In dieser Arbeit wurde ein apoptotischer Zelltod in den Kleinhirnneuronen nicht durch eine Erniedrigung der Kaliumkonzentrationen induziert, da ein apoptotischer Zelltod in diesem Modell nicht in allen Kleinhirnneuronen synchron eingeleitet werden kann (Chang und Wang, 1997). Ein Tag nach dem Mediumwechsel sind in diesem Modellsystem nur ungefähr 50 Prozent der Neurone apoptotisch (Chang und Wang, 1997). Da in Zellkultur dem apoptotischen Zelltod ein sekundärer nekrotischer Zelltod folgt, liegen zu einem gegebenen Zeitpunkt nach dem Mediumwechsel immer apoptotische und sekundär nekrotische Kleinhirnneurone nebeneinander vor.

In dem Apoptosemodell, in dem die Neurone mit NO-Donatoren behandelt werden, wird dagegen ein apoptotischer Zelltod innerhalb sehr kurzer Zeit in der Mehrzahl der Neurone ausgelöst (Leist et al., 1997). So konnte zwei bis drei Stunden nach einer Behandlung der Kleinhirnneurone mit 150 μ M S-Nitrosocystein (SNOC) ein apoptotischer Zelltod in 85-100 Prozent der Zellen festgestellt werden (Leist et al., 1997). Ein sekundär nekrotischer Zelltod ist in diesen Kulturen erst viele Stunden nach der SNOC-Behandlung nachweisbar (Leist et al., 1997). Ob überwiegend ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod von Neuronen durch NO-Donatoren ausgelöst wird, hängt von den eingesetzten Konzentrationen der Donatoren und den Kulturbedingungen der Neurone ab (Bonfoco et al., 1995). Bei sehr hohen Konzentrationen (100 μ M Peroxynitrit) wird überwiegend ein Zelltod mit nekrotischen Merkmalen ausgelöst, während bei niedrigeren Konzentrationen (10 μ M Peroxynitrit oder 200 μ M SNOC) überwiegend ein Zelltod mit apoptotischen Merkmalen ausgelöst wird (Bonfoco et al., 1995).

In dem hier verwendeten Modell konnten durch 100 μ M SNOC charakteristische Merkmale des apoptotischen Zelltods, wie Zerfall des Neuritennetzwerkes, Schrumpfung der Zellkörper, Kondensation des Chromatins, Fragmentation der DNA und Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran innerhalb weniger Stunden nach Zugabe von SNOC nachgewiesen werden. Eine Quantifikation der apoptotischen und nekrotischen Neuronen in dieser Arbeit zeigte, daß sechs Stunden nach der SNOC-

Behandlung 86 % der Kleinhirneurone kondensiertes Chromatin im Zellkern, aber keine PI-durchlässige Zellmembran aufwiesen, daher also überwiegend apoptotisch waren. Eine sekundäre Nekrose in 24 % der Zellen trat erst deutlich später (18 Stunden) nach der SNOC-Behandlung auf. Die in dieser Arbeit verwendeten Parameter der SNOC-Behandlung induzierten daher innerhalb kurzer Zeit einen hohen Prozentsatz apoptotischer Neurone, während es zu keiner Auslösung eines nekrotischer Zelltod durch die SNOC-Behandlung kam. Dieses Modellsystem war daher geeignet, um es für die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen einzusetzen. Allerdings konnte auch in den unbehandelten Kontrollkulturen, abhängig von der jeweiligen Präparation an unterschiedlichen Tagen, eine spontane Apoptose im unterschiedlichem Ausmaß festgestellt werden (18.3 ± 2.2 %, von 6.6 bis 45.7 %). Diese Variabilität in den einzelnen Neuronenkulturen, basierte auf die schwierigen Kulturbedingungen der Kleinhirneurone und konnte nicht vermieden werden. Daher mußten die Einzelexperimente auf die jeweiligen Kontrollen normiert werden.

5.2 Direkter Zell-Zell-Kontakt ist notwendig für die Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen

Apoptotische Zellen im peripheren Immunsystem produzieren keine löslichen Signale, durch die Phagozyten angelockt werden (Duvall et al., 1985; Savill et al., 1993). Aus diesem Grund werden apoptotische Zellen über direkte Zell-Zell-Interaktionen mit professionellen bzw. semiprofessionellen Phagozyten in der unmittelbaren Umgebung der apoptotischen Zelle erkannt (Savill 1997).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß apoptotische Kleinhirneurone ebenfalls keine löslichen Signale produzierten, die chemoattraktiv auf Mikrogliazellen wirken (Abb.8 in 4.2). Eine deutliche chemotaktische Reaktion der Mikrogliazellen konnte dagegen in drei von sieben Versuchen mit Überständen von nekrotischen Neuronen festgestellt werden. Dies zeigt, daß zytoplasmatische Bestandteile von nekrotischen Zellen Substanzen enthalten, die chemoattraktiv auf Mikrogliazellen wirken. Im Gegensatz zu apoptotischen Neuronen könnten nekrotische Neurone eine Aktivierung der Mikrogliazellen in Bezug auf eine Migration der Mikroglia zum Ort des Zelltods im Gewebe auslösen und vermutlich eine inflammatorische Reaktion induzieren. Eine Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen beruht, wie im peripheren Immunsystem, auf einen direkten Zellkontakt

zu benachbarten Mikrogliazellen. Dieses konnte durch Videozeitraffer Studien bestätigt werden. In Kokulturen mit SNOC behandelten Neuronen wanderten die Mikrogliazellen nicht gerichtet auf apoptotische Neurone zu (Abb.9 in 4.2). Die Lamellipodien der Mikrogliazelle nahmen Kontakt mit den Neuronen in der direkten Nachbarschaft auf, wobei nur apoptotische Neurone phagozytiert wurden.

5.3 Mikrogliazellen erkennen und binden/phagozytieren apoptotische Neurone

In den meisten *in vitro* Studien zur Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten werden adhärente Phagozyten mit einer Suspension aus apoptotische Zielzellen inkubiert (Hughes et al., 1997; Adayev et al., 1998). Dieser Ansatz konnte in dieser Arbeit nicht verwendet werden, da eine Ablösung der Kleinhirneurone zu einem massiven nekrotischen Zelltod führte. Um eine Verletzung der Neuronenpopulation durch die Ablösung zu vermeiden, wurden frisch abgeschüttelte Mikrogliazellen zu apoptotischen- und Kontrollneuronen, die sich auf Deckgläsern befanden, gegeben. Da eine Apoptose einiger Neurone ebenfalls in den unbehandelten Kontrollkulturen auftrat, konnte eine Bindung und Phagozytose apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen auch in diesen Kontrollkulturen festgestellt werden. Eine Bindung nicht apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen konnte nicht beobachtet werden. In den Kokulturen mit den SNOC-behandelten, apoptotischen Neuronen wurde eine signifikant höhere Bindung und Phagozytose apoptotischer Neurone durch die Mikrogliazellen im Vergleich zu den Kokulturen mit Kontrollneuronen festgestellt (Abb.10 in 4.3). Apoptotische Neurone werden daher spezifisch von den Mikrogliazellen erkannt und phagozytiert. Bei der Quantifikation der Bindung und Phagozytose wurden nur die kondensierten Zellkerne gezählt, die nach mehrmaligem Waschen noch mit der jeweiligen Mikrogliazelle assoziiert waren. Da mit dieser Methode nicht eindeutig zwischen einer Bindung oder einer bereits erfolgten Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch die Mikroglia unterschieden werden konnte, stellen die Ergebnisse immer eine Bindung und/oder Phagozytose der apoptotischen Neurone durch Mikrogliazellen dar. In dem hier verwendeten Modellansatz phagozytierten 27 % der Mikroglia apoptotische Neurone. Dies ist im Vergleich zu dem Modellansatz, in denen apoptotische Zellen zu adhärenen Phagozyten gegeben wurden, gering (78 %) (Duvall et al., 1985). Dies kann durch die geringe Migration/Translokation

der Mikroglia erklärt werden. In dem hier verwendeten Modell mußten sich die Mikrogliazellen zunächst auf dem Substrat absetzen und nahmen dann Kontakt zu den Neuronen in der unmittelbaren Umgebung auf. In dem umgekehrten Modellansatz wurden apoptotische Zellen auf bereits adhärenzte Phagozyten gegeben, wodurch ein schneller Kontakt zwischen vielen, sich in der Suspension befindenden, apoptotischen Zellen und adhärenzten Phagozyten ermöglicht wurde (Duvall et al., 1985). So kam es bereits 15 Minuten nach Zugabe von apoptotischen Thymozyten zu einer Bindung an Makrophagen (Duvall et al., 1985). Zur Erhöhung der Phagozytoserate in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell wäre eine längere Inkubationsphase nicht sinnvoll gewesen, da phagozytierte apoptotische Zellen innerhalb der Phagozyten innerhalb kurzer Zeit abgebaut werden und dann nicht mehr anhand ihrer Kernmorphologie identifiziert werden können. Für apoptotische Zellen in *C.elegans* wurde beispielsweise eine Abbauphase von einer Stunde ermittelt (Ellis et al., 1991). Daher muß berücksichtigt werden, daß innerhalb der drei bis sechs Stunden des Phagozytoseassays bereits phagozytierte Zellen abgebaut wurden und die tatsächliche Rate der Phagozytose daher wahrscheinlich höher liegt.

5.4 Die Erkennung der Neurone durch Mikrogliazellen hängt von spezifischen Kohlenhydraten auf der Oberfläche apoptotischer Neurone ab

Veränderungen des Glykosilierungsmusters auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen stellen ein Signal für die Phagozytose durch Makrophagen und semiprofessionelle Phagozyten dar (siehe 1.4.1.1). Hierbei kommt es wahrscheinlich zum Verlust von terminalen Sialinsäureresten der Zuckerstrukturen der Glykoproteine, wodurch N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und Galaktose auf der Außenseite der Plasmamembran exponiert werden (Duvall et al., 1985). Diese Zuckerreste wiederum können durch Lektine, die auf Makrophagen exprimiert sind, erkannt werden (Dini et al., 1992; Savill et al., 1993; Savill 1997). Diese Bindung kann durch spezifische Zucker, wie N-Acetylglukosamin, die an die Lektine der Makrophagen binden, kompetitiv inhibiert werden (Savill et al., 1989). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Phagozytose apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen durch Galaktose, und in einem geringeren Maße auch durch N-Acetylglukosamin inhibiert wurde. Andere Zucker, wie Mannose, Fucose oder Glukose konnten die Phagozytose apoptotischer Neurone nicht blockieren.

Dies deutet darauf hin, daß zur Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen eine Interaktion zwischen einem neuronalen Kohlenhydratrest und einem Lektin der Mikroglia möglich ist. Das Mikroglialektin für diese Erkennung ist bisher noch nicht charakterisiert. Da Galaktose und N-Acetylglukosamin die Aufnahme bzw. Bindung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen inhibieren, könnte ein spezifischer Galaktose- oder/und ein Asialoglykoprotein ähnlicher Rezeptor bei der Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen eine Rolle spielen. Diese Rezeptoren, die sich durch Galaktose und N-Acetylglukosamin kompetitiv inhibieren lassen, spielen auch bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch semiprofessionelle Phagozyten des peripheren Immunsystems eine Rolle (Dini et al., 1992). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dieses Inhibitionsmuster durch Monosaccharide mit der Exposition der möglichen Kohlenhydratreste auf der Oberfläche der apoptotischen Neurone übereinstimmt. Diese Kohlenhydratreste treten möglicherweise erst in späteren Phasen des apoptotischen Prozesses auf (siehe 1.4.1.1). Aus diesem Grund könnte eine Erkennung und Bindung von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen mit Hilfe von Lektinen einen untergeordneten Erkennungsmechanismus darstellen, was den eher geringen inhibitorischen Effekt durch Galaktose und N-Acetylglukosamin erklären würde. Andererseits könnte der geringe Inhibitionseffekt von Monosacchariden auf die Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikroglia auch bedeuten, daß Monosaccharide schlechte Inhibitoren für eine Lektinbindung darstellen, da die Lektine komplexere Zuckerstrukturen als einzelne Zuckerreste erkennen könnten (Duvall et al., 1985).

5.5 Die Thrombospondin vermittelte Erkennung von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen

Die Erkennung apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen erfolgt mit Hilfe des Zelladhäsionsmoleküls Thrombospondin-1 (TSP1), welches sowohl an der apoptotischen Zelle als auch an dem Makrophagen binden kann (siehe 1.4.1.3). TSP1 bindet auf Seiten der apoptotischen Zelle an anionische TSP1 Bindungsstellen und auf Seiten des Makrophagen an einen TSP1-Rezeptor (TSP-R), der sich aus dem CD36 und dem Vitronektin Rezeptor $\alpha v \beta 3$ -Integrin zusammensetzt (Savill et al., 1990). Die Erkennung apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen kann spezifisch durch kationische

Aminozucker, wie Mannosamin, inhibiert werden, die die anionischen TSP1 Bindungsstellen auf den apoptotischen Zellen maskieren (Savill et al., 1990; Savill et al., 1992; Savill et al., 1993; Ren et al., 1995). Die kationischen Aminozucker Mannosamin und Glukosamin übten in dieser Arbeit einen unspezifischen toxischen Effekt auf Mikrogliazellen aus. Dieser toxische Effekt könnte auf die freie Aminogruppe in diesen Monosacchariden zurückzuführen sein, die mit Molekülen auf der Mikroglia reagieren könnten. In subtoxischen Konzentrationen konnte durch diese Zucker keine Inhibition auf die Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen festgestellt werden.

RGD Peptide, die an den Vitronektin Rezeptor binden, sowie Antikörper gegen den Vitronektin Rezeptor, das CD36 und das TSP1 üben inhibitorische Effekte auf die Erkennung von apoptotischen Eosinophilen und Lymphozyten durch Makrophagen aus (Savill et al., 1992). Die Aufnahme von apoptotischen Kleinhirneuronen durch Mikrogliazellen konnte in dieser Arbeit durch das Tetrapeptid RGDS reduziert werden. Dies deutet auf eine Integrin-vermittelte Erkennung hin. Dieses Integrin könnte den Vitronektinrezeptor darstellen, der bei der TSP1 vermittelten Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen eine Rolle spielt und auch von den Mikrogliazellen exprimiert wird (Akiyama et al., 1991; Savill et al., 1993). Aufgrund der immunohistochemischen Lokalisation von TSP1 auf reaktiven Mikroglia *in vivo* dient TSP1 als Marker für phagozytierende Mikroglia (Moller et al., 1996; Kreutzberg 1996). TSP1 könnte daher Mikrogliazellen und apoptotische Neurone verbinden. Ob TSP1 zusätzlich auch an das CD36 Molekül bindet, wie für Makrophagen gezeigt wurde, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da inhibitorische Antikörper gegen die CD36 Komponenten des TSP1-R für das Rattensystem nicht erhältlich waren. Da CD36 wahrscheinlich einen verstärkenden Effekt bei der Erkennung von apoptotischen Zellen durch Phagozyten ausübt, könnte der geringe Inhibitionseffekt durch das RGDS-Peptid auf den fehlenden Beitrag des CD36 Moleküls hindeuten (Savill 1997). Der TSP1-vermittelte- und der PS-Erkennungsmechanismus ist bei der Erkennung von apoptotischen Lymphozyten durch nicht aktivierte Makrophagen von Bedeutung. Bei aktivierten Makrophagen führt hauptsächlich die Erkennung von Zuckerstrukturen und PS zur Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durch Makrophagen (Pradhan et al., 1997). Liegen ähnliche Gesetzmäßigkeiten auch bei Mikrogliazellen vor, könnte dies ebenfalls eine Erklärung für den geringen inhibitorischen Effekt von dem RGDS-Peptid sein, da die Versuche mit kultivierten, und somit bereits aktivierten Mikrogliazellen durchgeführt wurden.

5.6 Die neuronale Phosphatidylserin Präsentation ist beteiligt bei der spezifischen Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen.

Das Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Plasmamembran von apoptotische Zellen kann durch Phosphatidylserinrezeptoren der Makrophagen erkannt werden und zu einer Phagozytose führen (siehe 1.4.1.2). Liposome aus PS oder das wasserlösliche PS Analogon O-Phospho-L-Serin (OPS) können die Erkennung apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen kompetitiv inhibieren (Fadok et al., 1992). Im neuronalen System konnte bereits gezeigt werden, daß die Präsentation von PS durch die neuronale Zelllinie HN2-5, welche durch ischämische Bedingungen zur Apoptose gebracht wurden, wichtig für die Phagozytose dieser Zellen durch Mikrogliazellen ist (Adayev et al., 1998). Jedoch erfolgte die PS Präsentation in der HN2-5 Zelllinie nur in späteren Stadien des apoptotischen Prozesses (Adayev et al., 1998). Die PS präsentierende neuronale Population in diesem Modell wies bereits einen Verlust der Membranintegrität auf, was auf eine sekundäre Nekrose hinweist. Folglich könnten diese Zellen verstärkt Ziel einer phagozytotischen Aufnahme geworden sein (siehe 4.2). Im Gegensatz zu dem Modell der neuronalen Apoptose an HN2-5 Zellen ist die Präsentation von PS in anderen apoptotischen Modellen ein früher Marker der Apoptose und tritt zeitlich früher als die DNA Fragmentation und der Verlust der Membranintegrität auf (Martin et al., 1995). In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell der Apoptoseauslösung in Neuronen des Kleinhirns durch den NO-Donator SNOC wurde ebenfalls eine Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran bei den Kleinhirnnuronen festgestellt. PS war auf der Oberfläche der Neurone bereits wenige Stunden nach dem apoptotischen Stimulus nachweisbar und daher in diesem Modellsystem ein früher Marker des apoptotischen Prozesses. Der Zeitverlauf der Annexin-V Färbung korrelierte mit den Veränderungen in der Zellkernmorphologie, was Vincent und Maiese, 1999 auch in primären Neuronen des Hippokampus beobachteten.

In dieser Arbeit konnte die Aufnahme apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen durch das wasserlösliche PS Analoga OPS reduziert werden. Dieses spricht für eine Erkennung von Phosphatidylserin auf apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen. OPS übte im Vergleich zu Zuckern und RGDS Peptiden den stärksten inhibitorischen Effekt aus. Dieser Erkennungsmechanismus könnte somit in dem hier untersuchten Zeitfenster eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen spielen. Da die Phosphatidylserinexpression in diesem Modell ein früher

Marker des apoptotischen Zelltods ist, können die apoptotischen Neurone durch diesen Erkennungsmechanismus schnell durch Mikroglia erkannt und phagozytiert werden. Mikrogliazellen konnten weiterhin spezifisch Lipidvesikel, die PS enthielten, binden und phagozytieren. Mikroglia exprimieren daher einen Rezeptor, der PS erkennen und binden kann. Die Bindung und Phagozytose der Phosphatidylserin angereicherten Lipidvesikel erfolgt durch die Mikrogliazellen sehr schnell (Bindung bereits nach fünf Minuten), was auf eine spezifische Erkennung des Phosphatidylserins hindeutet. Ob die Interaktion durch einen bestimmten Mikroglia-rezeptor für PS oder durch bereits bekannte Rezeptoren vermittelt wird, muß noch untersucht werden. Viele Rezeptorsysteme kommen für eine PS Erkennung durch Makrophagen in Frage (siehe 1.4.1.2). Es werden beispielsweise die Scavenger Rezeptoren CD36 und CD68 und der LPS-Rezeptor CD14 diskutiert (Platt et al., 1998; Fadok et al., 1998). Die meisten dieser Moleküle wurden auch auf Mikrogliazellen gefunden (Becher et al., 1996; Nakamura et al., 1999). Ob PS direkt durch Phagozyten erkannt wird, oder nur in Verbindung mit weiteren Molekülen, die einen Ligandenkomplex bilden, ist bisher noch nicht bekannt. Da einige Phagozyten PS exprimierende Zellen binden, ohne sie zu phagozytieren, scheint die Phagozytose der apoptotischen Zellen durch Phagozyten noch von weiteren Faktoren abhängig zu sein (Savill 1997). Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie konnte in dieser Arbeit jedoch die Phagozytose von PS-LUVs nachgewiesen werden. Da die PS-LUVs sonst nur aus Phospholipiden bestehen, die von den Mikrogliazellen nicht erkannt werden, (kaum nachweisbare Bindung von PC-LUVs), scheint PS zur Initiation der Phagozytose auszureichen. Auch unter physiologischen Bedingungen könnten einige PS-Moleküle in der äußeren Schicht der Plasmamembrandoppelschicht vorkommen (0,6 mol% der Phospholipide) (Roelofsen und Op den Kamp, 1994). Dies könnte darauf hinweisen, daß ausschließlich Zellen phagozytiert werden, die eine bestimmte Konzentration von Phosphatidylserin auf der Außenseite exprimieren. Diese Annahme konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da nur LUVs gebunden und phagozytiert wurden, die aus 10 bzw. 1 mol% PS bestanden. LUVs mit 0,1 mol% konnten dagegen nicht spezifisch durch die Mikrogliazellen gebunden werden. Die Bindung und Phagozytose der Lipidvesikel hängt daher von der Konzentration des exponierten PS ab, denn es wurden nur Lipidvesikel phagozytiert, die bereits eine hohe Phosphatidylserinkonzentration aufwiesen, wie sie wahrscheinlich auch bei apoptotischen Zellen in der äußeren Plasmamembransicht vorkommen (2-4 mol% der Phospholipide).

Die verwendeten Inhibitoren Galaktose, N-Acetylglukosamin, RGDS oder OPS konnten die Phagozytose apoptotischer Neurone nicht vollständig blockieren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die anderen hier untersuchten Erkennungsmechanismen den jeweils blockierten Erkennungsmechanismus kompensieren konnten. Ob ein einzelner Erkennungsmechanismus ausreichend für die Entfernung von apoptotischen Neuronen aus dem Gewebe ist, muß noch untersucht werden. Ob die in dieser Arbeit untersuchten Erkennungsmechanismen die einzigen sind, durch die apoptotische Neurone durch Mikrogliazellen erkannt werden können, ist ebenfalls noch unbekannt. Da die einzelnen Inhibitoren, insbesondere die Zucker, in sehr hohen Konzentrationen verwendet wurden, konnten sie nicht gleichzeitig im Interaktionsmodell eingesetzt werden, da dann ein toxischer Effekt eintrat. Daher läßt sich bislang nicht sagen, ob die Blockierung unter diesen Bedingungen vollständig war, womit andere Erkennungsmechanismen ausgeschlossen werden würden. Mit Hilfe spezifischer Antikörper, die auch in geringen Konzentrationen einsetzbar wären, könnte diese Frage geklärt werden. Da jedoch die Lektine und auch die Phosphatidylserinrezeptoren der Phagozyten noch nicht näher identifiziert sind und daher spezifische Antikörper nicht vorliegen, konnten diese Versuche nicht durchgeführt werden.

5.7 Phosphatidylserin Rezeptoren sind konstitutiv auf den Mikrogliazellen exprimiert

Apoptotische Zellen, die auch unter physiologischen Bedingungen im zentralen Nervensystem vorkommen, müssen durch Phagozyten erkannt werden (Savill 1997). Die Expression von Rezeptoren zur Erkennung von apoptotischen Zellen sollte somit konstitutiv auf den Phagozyten exprimiert und vom Aktivierungszustand des Phagozyten unabhängig sein. Ramifizierte Mikrogliazellen, die sich ebenfalls zu einem geringen Prozentsatz in den Mikrogliaulturen befanden, phagozytierten apoptotische, PS exprimierende Neurone nicht (Adayev et al., 1998). Diese Neuronen wiesen jedoch bereits eine durchlässige Plasmamembran auf, ein Merkmal nekrotischer Zellen, wodurch sie wahrscheinlich eher zum Ziel für bereits aktivierte Mikroglia wurden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Lipidvesikel, die PS enthielten, von unterschiedlich aktivierten Mikrogliazellen in Kultur erkannt und gebunden wurden. Dies zeigt, daß die Expression des PS Rezeptors vom Aktivierungszustand der Mikrogliazelle unabhängig ist.

Da jedoch die Versuche zu dieser Fragestellung mit kultivierten Mikroglia durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die ruhenden Mikroglia im Gewebe den spezifischen Rezeptor für PS nicht exprimieren. Kultivierte, ramifizierte Mikrogliazellen sind aufgrund ihres elektrophysiologischen Profils bereits aktiviert, obwohl sie morphologisch ruhenden Mikrogliazellen im Gewebe ähneln (Eder et al., 1999). Eine Quantifikation der Bindung und Phagozytose der PS-Lipidvesikel durch die unterschiedlich kultivierten Mikrogliazellen wurde nicht vorgenommen, weshalb letztendlich keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die Bindung oder Phagozytose der PS-Lipidvesikel in unterschiedlichen Aktivierungszuständen der Mikrogliazelle unterschiedlich stark ist.

5.8 Eine Phagozytose von Lipidvesikeln, die Phosphatidylserin enthalten, löst keine sekretorische Aktivierung von Mikrogliazellen aus

Die Phagozytose von apoptotischen Zellen ist im peripheren System nicht mit einer Aktivierung von Phagozyten verbunden, wodurch ein inflammatorischer Prozess vermieden wird (Fadok et al., 1998b; Devitt et al., 1998). Vielmehr kommt es zur Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie TGF- β , wenn Phagozyten apoptotische Zellen aufnehmen (Green und Beere, 2000). Ein Aktivierungsprozess von Mikrogliazellen aufgrund pathologischer Ereignisse ist mit einer verstärkten Expression von immunrelevanten Oberflächenmolekülen auf der Mikrogliazelle verbunden (Kreutzberg 1996). Zusätzlich kommt es zu einer Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-6 und IL-12, und Chemokinen, wie MIP-1 α und KC (Nakamura et al., 1999; Prinz et al., 1999). Durch zytotoxische Zytokine (z.B. TNF- α) und andere Zytotoxine (z.B. Sauerstoffradikale) werden benachbarte Zellen, wie Oligodendrozyten geschädigt (Selmaj et al., 1991; Downen et al., 1999). Dadurch können aktivierte Mikrogliazellen eine inflammatorische Antwort auslösen. Die Erkennung und Phagozytose von PS-LUVs, als Modell für apoptotische, PS-präsentierende Zellen, konnte in dieser Arbeit nicht mit einer erhöhten Sekretion von den Zytokinen TNF- α , IL-6 und IL-12 und den Chemokinen MIP-1- α und KC durch Mikrogliazellen in Zusammenhang gebracht werden. Dies läßt darauf schließen, daß die Erkennung von Phosphatidylserin und die daraufhin eingeleitete Phagozytose nicht mit einer sekretorischen Aktivierung der Mikrogliazelle verbunden ist. Aufgrund einer raschen, PS-Rezeptor vermittelten

Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen könnte daher, wie im peripheren Immunsystem, ein inflammatorischer Prozess vermieden werden. Ob die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Mikrogliazellen einen antiinflammatorischen Effekt ausübt, im Sinne einer reduzierten Sekretion konstitutiv produzierter Zytokine und Chemokine oder einer gesteigerten Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine, wie im peripheren Immunsystem gezeigt (Fadok et al., 1998), muß noch untersucht werden.

5.9 Erkennung und Phagozytose von Phosphatidylserin durch Astrozyten

Auch semiprofessionelle Phagozyten können apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren (Dini et al., 1992). Astrozyten, die phagozytotisch aktiv werden, (Bechmann und Nitsch, 1997), könnten ebenfalls eine Rolle bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen spielen. Für die sogenannten semiprofessionellen Phagozyten wird angenommen, daß apoptotische Zellen überwiegend an ihre Erkennung von veränderten Zuckerstrukturen auf der Oberfläche erkannt werden (Dini et al., 1992). Da die Exposition der veränderten Zuckerstrukturen wahrscheinlich eine Folge von späten Ereignissen des apoptotischen Prozesses ist (Savill 1997), erkennen semiprofessionelle Phagozyten apoptotische Zellen möglicherweise erst in späteren Phasen der Apoptose. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sind auch Astrozyten im Gegensatz zu Oligodendrozyten, in der Lage, PS-haltige Lipidvesikel zu binden und zu phagozytieren. Somit könnten auch Astrozyten spezifische Phosphatidylserinrezeptoren besitzen, wodurch sie apoptotische Zellen erkennen könnten, die Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran exponieren. Da die Präsentation von Phosphatidylserin ein sehr früher Marker der Apoptose ist, könnten die semiprofessionellen Astrozyten apoptotische Zellen sehr früh erkennen und phagozytieren. In wie weit Astrozyten bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen *in vivo* und *in vitro* beteiligt sind, muß jedoch noch gezeigt werden.

5.10 Die Erkennung von Phosphatidylserin ist mit einem Kalziumsignal in der Mikrogliazelle verbunden

Die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen ist im Gegensatz zu der Phagozytose durch Makrophagen mit einer intrazellulären Erhöhung der Kalziumkonzentration verbunden (Rubartelli et al., 1997). In dieser Arbeit wurde gezeigt,

daß die Bindung von PS-Lipidvesikeln mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in der Mikrogliazelle verbunden ist. Die Bindung apoptotischer Zellen durch einen PS-Rezeptor auf Seiten der Mikrogliazelle könnte daher ebenfalls zu einem Kalziumsignal in der Mikrogliazelle führen. Die durch PS-LUVs induzierten Kalziumsignale zeigten einen schnellen Anstieg, der sehr schnell wieder auf den Anfangswert vor der Stimulation zurück ging. Dieses Kalziumsignal unterscheidet sich von dem Kalziumsignal, welches bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen beobachtet wurde (Rubartelli et al., 1997). Letzteres zeichnet sich ebenfalls durch einen schnellen Anstieg aus, jedoch bleibt die intrazelluläre Kalziumkonzentration in diesen Zellen anschließend erhöht (Rubartelli et al., 1997). Möglicherweise kommt es in dendritischen Zellen deshalb zu einem anderen zeitlichen Verlauf des intrazellulären Kalziumsignals, weil die Bindung/Aufnahme apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen und damit die intrazellulären Signalkaskaden, auf einem TSP-vermittelten Mechanismus beruhen. An der Aufnahme der PS-LUVs durch Mikrogliazellen könnten Scavenger Rezeptoren oder das CD14-Molekül beteiligt sein. Bei der Aktivierung von Scavenger Rezeptoren wurden im Gegensatz zu einer Aktivierung des CD14 Moleküls intrazelluläre Kalziumsignale festgestellt (Hurme et al., 1992; Pollaud et al., 1997). Ob das intrazelluläre Kalziumsignal ebenfalls, wie bei dendritischen Zellen, bei der Phagozytose von PS-LUVs oder PS-präsentierenden apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen notwendig ist, könnte mit Hilfe von Kalziumchelatoren noch untersucht werden.

5.11 Ausblick

Die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen ist schnell, effizient und verhindert eine inflammatorische und immunologische Antwort (Savill 1997). In dieser Arbeit konnte erstmalig in einem *in vitro* Modell des ZNS gezeigt werden, daß bei der Erkennung apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen gleiche Prinzipien gelten, wie im peripheren Immunsystem. Unterschiedliche Rezeptorsysteme der Mikrogliazellen sind hierbei an der Erkennung und Aufnahme beteiligt. Ob das spezifische Rezeptorsystem zur Erkennung apoptotischer Zellen im ZNS ebenfalls vom Typ der zu phagozytierenden apoptotischen Zelle abhängt, wie im peripheren Immunsystem gezeigt werden konnte, ist bisher nicht bekannt. Weiterhin muß noch überprüft werden, ob die in dieser Arbeit gefundenen Erkennungsmechanismen apoptotischer Zellen *in vitro* auch *in vivo* gelten.

Ein Ausbleiben der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Phagozyten aufgrund von Fehlern in der Erkennung apoptotischer Zellen könnte ein bisher unbekannter Faktor in der Pathogenese von inflammatorischen oder immunologischen Krankheiten darstellen (Ren und Savill, 1998). Sekundär nekrotische Zellen induzieren eine inflammatorische Antwort und führen zum Absterben benachbarter Zellen im Gewebe. Nach einer Ischämie treten im Gewebe nekrotische Zellen auf, die auch apoptotische Merkmale aufweisen (Martin et al., 1998). Bei diesen Zellen könnte es sich um apoptotische Zellen handeln, die nicht phagozytiert worden sind. Es wäre daher sinnvoll, Therapien zu entwickeln, durch die es zu einer erhöhten phagozytotischen Entfernung von apoptotischen Zellen kommt. Möglicherweise haben aktivierende Zytokine dabei einen selektiven Einfluß auf die phagozytotische Aktivität. Außerdem ergeben sich aus der Charakterisierung der Erkennungsmechanismen apoptotischer Zellen durch Phagozyten zukünftig vielleicht auch therapeutische Ansätze, in denen unerwünschte Zellen, wie Tumorzellen, durch die Induktion eines Erkennungssignals für Phagozyten markiert werden und somit effektiver beseitigt werden könnten.

6 Zusammenfassung

Mikrogliazellen stellen die professionellen Phagozyten des zentralen Nervensystems dar und sind maßgeblich bei der Entfernung apoptotischer Neurone aus dem Gewebe beteiligt. Die Erkennungsmechanismen, die zu einer Erkennung und Phagozytose apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen führen, sind bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines Kokulturmodells die Erkennungsmechanismen zwischen primären Mikrogliazellen und apoptotischen Kleinhirnneuronen untersucht. Der apoptotische Zelltod, charakterisiert durch Schrumpfung und Fragmentation der Neuron, durch Kondensation des Chromatins, durch Fragmentation der DNA und durch Präsentation von Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, wurde in den Kleinhirnneuronen durch eine Behandlung mit 100 μ M S-Nitrosocystein induziert. Es konnte gezeigt werden, daß apoptotische Neurone keine löslichen Substanzen sekretierten, die chemotaktisch auf Mikrogliazellen wirken. Dies zeigt, daß die Erkennung apoptotischer Neurone über Zell-Zell-Kontakte erfolgt. Zur Untersuchung der beteiligten Erkennungsmechanismen wurden Mikrogliazellen zwei Stunden nach der Induktion des apoptotischen Zelltods zu den Neuronen gegeben und für sechs Stunden in Gegenwart oder Abwesenheit von Liganden kultiviert, die mögliche Rezeptoren zur Erkennung von apoptotischen Neuronen inhibieren. Die Bindung/Phagozytose der apoptotischen Kleinhirnneurone durch Mikrogliazellen wurde mit einer kombinierten DAPI/Propidiumjodid (für apoptotische/nekrotische Zellen) und einer Lektin Färbung (für Mikrogliazellen) durch Auszählung bestimmt. Die Aufnahme apoptotischer Neurone durch Mikrogliazellen wurde durch Galaktose und N-Acetylglukosamin reduziert, was auf eine Erkennung apoptotischer Zellen durch Lektine hindeutet. Weiterhin weist der inhibitorische Effekt von RGDS-Peptiden auf die Bindung/Phagozytose von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen auf eine Erkennung durch ein Vitronektinrezeptor hin. Da Mikrogliazellen spezifisch Lipidvesikel, die mit Phosphatidylserin angereichert waren, binden und O-Phospho-L-Serin die Aufnahme von apoptotischen Neuronen durch Mikrogliazellen deutlich inhibierte, erfolgte die Erkennung apoptotischer Neurone hauptsächlich durch einen Phosphatidylserin Rezeptor. Die Expression des PS-Rezeptors auf Mikrogliazellen ist unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikrogliazellen *in vitro*. Die Bindung von PS ist mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in der Mikrogliazelle verbunden und führt nicht zu einer sekretorischen Aktivierung der Mikrogliazelle. Da Astrozyten ebenfalls einen PS-Rezeptor exprimieren, könnten sie als

semiprofessionelle Phagozyten ebenfalls eine Bedeutung bei der Aufnahme apoptotischer Neurone einnehmen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß apoptotische Neurone ein komplexes Oberflächenmuster exprimieren, welches durch unterschiedliche Rezeptorsysteme der Mikrogliazelle erkannt werden kann. Die Erkennung von PS auf apoptotischen Neuronen durch Mikroglia scheint bei diesen untersuchten Rezeptorsystemen die wichtigste Rolle zu spielen.

Literaturverzeichnis

- abd-el Basset und Fedoroff, 1995 : abd-el Basset, E. and Fedoroff, S. (1995) Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J.Neurosci.Res.* 41 (2) , 222-237.
- Adayev et al., 1998 : Adayev, T., Estephan, R., Meserole, S., Mazza, B., Yurkow, E. J., and Banerjee, P. (1998) Externalization of phosphatidylserine may not be an early signal of apoptosis in neuronal cells, but only the phosphatidylserine- displaying apoptotic cells are phagocytosed by microglia. *J.Neurochem.* 71 (5) , 1854-1864.
- Aderem und Underhill, 1999 : Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17 , 593-623.
- Agid et al., 1996 : Agid, Y., Hirsch, E., Anglade, P., Michel, P., Brugg, B., and Ruberg, M. (1996) Aging, disease and death of nerve cells. *Acta Neurol.Belg.* 96 (3) , 219-223.
- Akiyama et al., 1991 : Akiyama, H., Kawamata, T., Dedhar, S., and McGeer, P. L. (1991) Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue. *J.Neuroimmunol.* 32 (1) , 19-28.
- Ankarcrona et al., 1995 : Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15 (4) , 961-973.
- Armstrong et al., 1997 : Armstrong R.C., Aja T.J., Hoang K.D., Gaur S., Bai X., Alnemri E.S., Litwack G., Karanewsky D.S., Fritz L.C. und Tomaselli K.J. (1997) Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J.Neurosci.* 17, 553-562.
- Aschner et al., 1999 : Aschner M., Allen J.W., Kimelberg H.K., LoPachin R.M. und Streit W.J. (1999) Glial cells in neurotoxicity development. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 39: 151-173.
- Ashwell, 1990 : Ashwell, K. (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 55 (2) , 219-230.
- Babich und Borenfreund, 1990 : Babich, H. and Borenfreund, E. (1990) Cytotoxic effects of food additives and pharmaceuticals on cells in culture as determined with the neutral red assay. *J.Pharm.Sci.* 79 (7) , 592-594.

- Bacon und Harrison, 2000 : Bacon K.B. und Harrison J.K. (2000) Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J.Neuroimmunol.* 104: 92-97
- Bahr und Bonhoeffer, 1994 : Bahr, M. and Bonhoeffer, F. (1994) Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *Trends.Neurosci.* 17 (11) , 473-479.
- Balasubramanian et al., 1997 : Balasubramanian K., Chandra J. und Schroit A.J. (1997) Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J.Biol.Chem.* 272: 31113-31117.
- Banati et al., 1993 : Banati, R. B., Gehrmann, J., Schubert, P., and Kreutzberg, G. W. (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7 (1) , 111-118.
- Bancher et al., 1997 : Bancher C., Paulus W., Paukner K., Jellinger K., Lassmann H., Breitschopf H. und Jellinger K.A. (1997) Neuropathologic diagnosis of Alzheimer disease: consensus between practicing neuropathologists? Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease. *Alzheimer.Dis. Assoc.Disord.* 50: 141-152.
- Barres und Raff, 1994 : Barres, B. A. and Raff, M. C. (1994) Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* 12 (5) , 935-942.
- Beauvais und Joly, 1999 : Beauvais, F. and Joly, F. (1999) Effects of nitric oxide on the eosinophil survival in vitro. A role for nitrosyl-heme. *FEBS Lett.* 443 (1) , 37-40.
- Becher et al., 1996 : Becher, B., Fedorowicz, V., and Antel, J. P. (1996) Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J.Neurosci.Res.* 45 (4) , 375-381.
- Bechmann und Nitsch, 1997 : Bechmann, I. and Nitsch, R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20 (2) , 145-154.
- Bell und Morrison, 1991 : Bell, D. A. and Morrison, B. (1991) The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to, nucleosomes in vitro. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 60 (1) , 13-26.
- Benveniste 1995 : Benveniste, E. N. (1995) Cytokine production. (46) , 700-713. New York , Oxford University Press.

- Bonetti et al., 1997 : Bonetti B., Pohl J., Gao Y.L. und Raine C.S. (1997) Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis. *J.Immunol.* 159: 5733-5741
- Bonfoco et al., 1995 : Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Lipton, S. A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92 (16) , 7162-7166.
- Bonfoco et al., 1996 : Bonfoco, E., Leist, M., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1996) Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J.Neurochem.* 67 (6) , 2484-2493.
- Boonman und Isacson, 1999 : Boonman Z. und Isacson O. (1999) Apoptosis in neuronal development and transplantation: role of caspases and trophic factors. *Exp.Neurol.* 156: 1-15.
- Borenfreund und Puerner, 1986 : Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1986) Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology* 39 (2) , 121-134.
- Bredesen 1995 : Bredesen, D. E. (1995) Neural apoptosis. *Ann.Neurol.* 38 (6) , 839-851.
- Burek und Oppenheim, 1996 : Burek, M. J. and Oppenheim, R. W. (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* 6 (4) , 427-446.
- Chang und Wang, 1997 : Chang, J. Y. and Wang, J. Z. (1997) Morphological and biochemical changes during programmed cell death of rat cerebellar granule cells. *Neurochem.Res.* 22 (1) , 43-48.
- Choi 1988 : Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1 (8) , 623-634.
- Choi 1996 : Choi, D.W. (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr.Opin. Neurobiol.* (6), 667-672
- Coyle und Puttfarcken, 1993 : Coyle J.T. und Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695.
- D'Mello et al., 1993 : D'Mello, S. R., Galli, C., Ciotti, T., and Calissano, P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 (23) , 10989-10993.
- Darzynkiewicz und Traganos, 1998 : Darzynkiewicz Z. und Traganos F. (1998) Measurement of apoptosis. *Adv.Biochem.Eng.Biotechnol.* 62: 33-73

- Devitt et al., 1998 : Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., and Gregory, C. D. (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392 (6675) , 505-509.
- Dini et al., 1992 : Dini, L., Autuori, F., Lentini, A., Oliverio, S., and Piacentini, M. (1992) The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor. *FEBS Lett.* 296 (2) , 174-178.
- Downen et al., 1999 : Downen M., Amaral T.D., Hua L.L., Zhao M.L. and Lee S.C. (1999) Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell cultures: role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia* 28: 114-127
- Drache et al., 1997 : Drache B., Diehl G.E., Beyreuther K., Perlmutter L.S. und Konig G. (1997) Bcl-xl-specific antibody labels activated microglia associated with Alzheimer's disease and other pathological states *J.Neurosci.Res.* 47: 98-108.
- Dragunow et al., 1998 : Dragunow, M., Mac Gibbon, G. A., Lawlor, P., Butterworth, N., Connor, B., Henderson, C., Walton, M., Woodgate, A., Hughes, P., and Faull, R. L. M. (1998) Apoptosis, neurotrophic factors and neurodegeneration. *Reviews in the Neurosciences* 8 , 223-265.
- Drejer et al., 1985 : Drejer, J., Larsson, O. M., Kvamme, E., Svenneby, G., Hertz, L., and Schousboe, A. (1985) Ontogenetic development of glutamate metabolizing enzymes in cultured cerebellar granule cells and in cerebellum in vivo. *Neurochem.Res.* 10 (1) , 49-62.
- Duvall und Wyllie 1986 : Duvall, E. and Wyllie, A. H. (1986) Death and the cell. *Immunol.Today* 7 (4)
- Duvall et al., 1985 : Duvall, E., Wyllie, A. H., and Morris, R. G. (1985) Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56 (2) , 351-358.
- Eder 1998 : Eder, C. (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am.J.Physiol.* 275 (2 Pt 1) , C327-C342.
- Eder et al., 1999 : Eder, C., Schilling, T., Heinemann, U., Haas, D., Hailer, N., and Nitsch, R. (1999) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur.J.Neurosci.* 11 (12) , 4251-4261.
- Elkabes et al., 1996 : Elkabes S., DiCicco B.E. und Black I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neutrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J.Neurosci.* 16: 2508-2521

- Ellis et al., 1991 : Ellis, R. E., Jacobson, D. M., and Horvitz, H. R. (1991) Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129 (1) , 79-94.
- Endemann et al., 1993 : Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., and Protter, A. A. (1993) CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 268 (16) , 11811-11816.
- Fadok et al., 1998a : Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., and Henson, P. M. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death.Differ.* 5 (7) , 551-562.
- Fadok et al., 1998b : Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J.Clin.Invest.* 101 (4) , 890-898.
- Fadok et al., 2000 : Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B., and Henson, P. M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405 (6782) , 85-90.
- Fadok et al., 1992 : Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.* 148 (7) , 2207-2216.
- Falasca et al., 1996 : Falasca, L., Bergamini, A., Serafino, A., Balabaud, C., and Dini, L. (1996) Human Kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes. *Exp.Cell Res.* 224 (1) , 152-162.
- Fedoroff 1995 : Fedoroff, S. (1995) Development of microglia. (10) , 162-181. New York , Oxford University Press.
- Flora und Gregory, 1994 : Flora, P. K. and Gregory, C. D. (1994) Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *Eur.J.Immunol.* 24 (11) , 2625-2632.
- Frost et al., 1999 : Frost, E. E., Buttery, P. C., Milner, R., and ffrench, Constant C. (1999) Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Curr.Biol.* 9 (21) , 1251-1254.
- Ghosh et al., 1994 : Ghosh, A., Carnahan, J., and Greenberg, M. E. (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263 (5153) , 1618-1623.

- Giulian und Baker, 1986 : Giulian, D. and Baker, T. J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J.Neurosci.* 6 (8) , 2163-2178.
- Gong et al., 1994 : Gong, J., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal.Biochem.* 218 (2) , 314-319.
- Gorczyca et al., 1992 : Gorczyca, W., Bruno, S., Melamed, M. R., and Darzynkiewicz, Z. (1992) Cell cycle-related expression of p120 nucleolar antigen in normal human lymphocytes and in cells of HL-60 and MOLT-4 leukemic lines: effects of methotrexate, camptothecin, and teniposide. *Cancer Res.* 52 (12) , 3491-3494.
- Gorman et al., 1996 : Gorman, A. M., McGowan, A., O'Neill, C., and Cotter, T. (1996) Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J.Neurol.Sci.* 139 Suppl , 45-52.
- Graeber et al., 1988 : Graeber, M. B., Streit, W. J., and Kreutzberg, G. W. (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J.Neurosci.Res.* 21 (1) , 18-24.
- Green und Beere, 2000 : Green, D. R. and Beere, H. M. (2000) Apoptosis - Gone but not forgotten. *Nature* 405 (6782) , 28-29.
- Grynkiewicz et al., 1985 : Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260 (6) , 3440-3450.
- Hao et al., 1991 : Hao, C., Richardson, A., and Fedoroff, S. (1991) Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int.J.Dev.Neurosci.* 9 (1) , 1-14.
- Hart und Fabry, 1995 : Hart, M. N. and Fabry, Z. (1995) CNS antigen presentation. *Trends.Neurosci.* 18 (11) , 475-481.
- Hart et al., 1996 : Hart, S. P., Haslett, C., and Dransfield, I. (1996) Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia* 52 (10-11) , 950-956.
- Henderson et al., 1993 : Henderson C.E., Camu W., Mettling C., Gouin A., Poulsen K., Karihaloo M., Rullamas J., Evans T., McMahon S.B. und Armanini M.P. (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bub. *Nature* 363: 266-270.

- Hickey et al., 1991 : Hickey, W. F., Hsu, B. L., and Kimura, H. (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J.Neurosci.Res.* 28 (2) , 254-260.
- Hickey et al., 1992 : Hickey, W. F., Vass, K., and Lassmann, H. (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 51 (3) , 246-256.
- Hughes et al., 1997 : Hughes, J., Liu, Y., Van Damme, J., and Savill, J. (1997) Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils: mediation by a novel CD36-independent vitronectin receptor/thrombospondin recognition mechanism that is uncoupled from chemokine secretion. *J.Immunol.* 158 (9) , 4389-4397.
- Hurme et al., 1992 : Hurme, M., Viherluoto, J., and Nordstrom, T. (1992) The effect of calcium mobilization on LPS-induced IL-1 beta production depends on the differentiation stage of the monocytes/macrophages. *Scand.J.Immunol.* 36 (3) , 507-511.
- Ilshner et al., 1996 : Ilshner S., Nolt C. und Kettenmann H. (1996) Complement factor C5a and epidermal growth factor trigger the activation of outward potassium currents in cultured murine microglia. *Neuroscience* 73 : 1109-1120.
- Ilshner et al., 1995 : Ilshner S., Ohlemeyer C., Gimpl G. und Kettenmann H. (1995) Modulation of potassium currents in cultured murine microglial cells by receptor activation and intracellular pathways. *Neuroscience* 66: 983-1000.
- Johnson et al., 1980 : Johnson, L. K., Vlodavsky, I., Baxter, J. D., and Gospodarowicz, D. (1980) Nuclear accumulation of epidermal growth factor in cultured rat pituitary cells. *Nature* 287 (5780) , 340-343.
- Kato et al., 1995 : Kato, H., Kogure, K., Araki, T., and Itoyama, Y. (1995) Graded expression of immunomolecules on activated microglia in the hippocampus following ischemia in a rat model of ischemic tolerance. *Brain Res.* 694 (1-2) , 85-93.
- Kelley et al., 1997 : Kelley E.E., Buettner G.R. und Burns C.P. (1997) Production of lipid-derived free radicals in L1210 murine leukemia cells is an early oxidative event in the photodynamic action of Photofrin. *Photochem.Photobiol.* 65: 576-580.
- Kerr et al., 1972 : Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26 (4) , 239-257.

- Kiechle und Zhang, 1998: Kiechle F.L. und Zhang X. (1998) Apoptosis: a brief review. *Journal of Clinical Ligand Assay* 21 , 58-61
- Konopski et al., 1995 : Konopski, Z., Fandrem, J., Seljelid, R., and Eskeland, T. (1995) Interferon-gamma inhibits endocytosis of soluble animated beta-1,3-D-glucan and neutral red in mouse peritoneal macrophages. *J.Interferon.Cytokine.Res.* 15 (7) , 597-603.
- Koopman et al., 1994 : Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van, Oers MH. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84 (5) , 1415-1420.
- Kreutzberg 1996 : Kreutzberg, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends.Neurosci.* 19 (8) , 312-318.
- Krueger et al., 1995 : Krueger B.K., Burne J.F. und Raff M.C. (1995) Evidence for large-scale astrocyte death in the developing cerebellum. *J.Neurosci.* 15: 3366-3374
- Kusiak et al., 1996 : Kusiak J.W. Izzo J.A. und Zhao B. (1996) Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? *Mol.Chem.Neuropathol.* 28: 153-162.
- Lassmann 1997 : Lassmann, H. (1997) Basic mechanisms of brain inflammation. *J.Neural Transm.Suppl.* 50 , 183-190.
- Lawson et al., 1990 : Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., and Gordon, S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39 (1) , 151-170.
- Lee et al., 1993 : Lee, S. C., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F., and Berman, J. W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J.Immunol.* 150 (7) , 2659-2667.
- Lei et al., 1992 : Lei, S. Z., Pan, Z. H., Aggarwal, S. K., Chen, H. S., Hartman, J., Sucher, N. J., and Lipton, S. A. (1992) Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8 (6) , 1087-1099.
- Leist et al., 1997 : Leist, M., Fava, E., Montecucco, C., and Nicotera, P. (1997) Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur.J.Neurosci.* 9 (7) , 1488-1498.

- Leist et al., 1995 : Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P. G., and Wendel, A. (1995) Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am.J.Pathol.* 146 (5) , 1220-1234.
- Leist und Nicotera, 1997 : Leist, M. and Nicotera, P. (1997) The shape of cell death. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 236 (1) , 1-9.
- Leist und Nicotera, 1998 : Leist, M. and Nicotera, P. (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp.Cell Res.* 239 (2) , 183-201.
- Li et al., 1995 : Li, Y., Chopp, M., Jiang, N., Yao, F., and Zaloga, C. (1995) Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15 (3) , 389-397.
- Ling und Wong, 1993 : Ling, E. A. and Wong, W. C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7 (1) , 9-18.
- Lipton und Nicotera, 1998 : Lipton S.A. und Nicotera P. (1998) Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium* 23: 165-171.
- Liu und Hengartner, 1999 : Liu, Q. A. and Hengartner, M. O. (1999) The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 887 , 92-104.
- Luciani und Chimini, 1996 : Luciani, M. F. and Chimini, G. (1996) The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO J.* 15 (2) , 226-235.
- Ludwin 1997 : Ludwin S.K. (1997) The pathobiology of the oligodendrocyte. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 56: 111-124.
- Manev et al., 1989 : Manev H., Favaron M., Guidotti A. und Costa E. (1989) Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol.Pharmacol.* 36: 106-112.
- Marguet et al., 1999 : Marguet, D., Luciani, M. F., Moynault, A., Williamson, P., and Chimini, G. (1999) Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocytes and prey. *Nature Cell Biology* 1
- Martin et al., 1998 : Martin, L. J., Al, Abdulla NA, Brambrink, A. M., Kirsch, J. R., Sieber, F. E., and Portera, Cailliau C. (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res.Bull.* 46 (4) , 281-309.

- Martin et al., 1995 : Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van, Schie RC, LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J.Exp.Med.* 182 (5) , 1545-1556.
- Matsumoto et al., 1992 : Matsumoto, Y., Ohmori, K., and Fujiwara, M. (1992) Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under in vivo-mimicking conditions. *Immunology* 76 (2) , 209-216.
- McGeer und McGeer, 1998 : McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (1998) Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer.Dis.Assoc.Disord.* 12 Suppl 2 , S1-S6.
- Meldrum und Garthwaite, 1990 : Meldrum, B. and Garthwaite, J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends.Pharmacol.Sci.* 11 (9) , 379-387.
- Meyer et al., 1995 : Meyer F.A., Kaplan M.R. Pfrieder F.W. und Barres B.A. (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15: 805-819.
- Moller et al., 1996 : Moller, J. C., Klein, M. A., Haas, S., Jones, L. L., Kreutzberg, G. W., and Raivich, G. (1996) Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17 (2) , 121-132.
- Moller et al., 1997 : MollerT., Nolte C., Burger R., Verkhatsky A. und Kettenmann H. (1997) Mechanisms of C5a und C3a complement fragment-induced [Ca²⁺]_i signaling in mouse microglia. *J.Neurosci.* 17: 615-624.
- Moynault et al., 1998 : Moynault, A., Luciani, M. F., and Chimini, G. (1998) ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene ced-7, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochem.Soc.Trans.* 26 (4) , 629-635.
- Nakamura et al., 1999 : Nakamura, Y., Si, Q. S., and Kataoka, K. (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci.Res.* 35 (2) , 95-100.
- Nakano et al., 1997 : Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., and Arita, H. (1997) Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J.Biol.Chem.* 272 (47) , 29411-29414.

- Narayanan 1997 : Narayanan, V. (1997) Apoptosis in development and disease of the nervous system: 1. Naturally occurring cell death in the developing nervous system. *Pediatr.Neurol.* 16 (1) , 9-13.
- Nicotera et al., 1997a : Nicotera P., Ankarcrona M., Bonfoco E., Orrenius S. und Lipton S.A. (1997) Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Adv. Neurol.* 72: 95-101.
- Nicotera und Leist, 1997 : Nicotera, P. and Leist, M. (1997) Apoptosis and control of cell death. , Marcel Dekker.
- Nicotera und Lipton, 1999 : Nicotera P. und Lipton S.A. (1999) Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J.Cereb.Blood. Flow Metab.* 19: 583-591
- Nolte et al., 1996 : Nolte, C., Moller, T., Walter, T., and Kettenmann, H. (1996) Complement 5a controls motility of murine microglial cells in vitro via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience* 73 (4) , 1091-1107.
- Ogasawara et al., 1993 : Ogasawara, J., Watanabe, Fukunaga R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364 (6440) , 806-809.
- Okado und Oppenheim, 1984 : Okado, N. and Oppenheim, R. W. (1984) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IX. The loss of motoneurons following removal of afferent inputs. *J.Neurosci.* 4 (6) , 1639-1652.
- Oppenheim, 1997 : Oppenheim, R. W. (1997) Related mechanisms of action of growth factors and antioxidants in apoptosis: an overview. *Adv.Neurol.* 72 , 69-78.
- Paresce et al., 1996 : Paresce D.M., Ghosh R.N. und Maxfield F.R. (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17: 553-565
- Perry und Gordon, 1991 : Perry, V. H. and Gordon, S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int.Rev.Cytol.* 125 , 203-244.
- Pettmann und Henderson, 1998 : Pettmann, B. and Henderson, C. E. (1998) Neuronal cell death. *Neuron* 20 (4) , 633-647.
- Platt et al., 1998 : Platt, N., da, Silva RP, and Gordon, S. (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends.Cell Biol.* 8 (9) , 365-372.

- Platt et al., 1996 : Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., and Gordon, S. (1996) Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 (22) , 12456-12460.
- Pollaud et al., 1997 : Pollaud C.C., Vandaele J., Quartulli F., Seguelas M.H., Decerprit J. und Pipy B. (1998) Involvement of calcium and arachidonate metabolim in acetylated-low-density-lipoprotein-stimulated tumor-necrosis-factor-alpha production by rat peritoneal macrophages. *Eur.J.Biochem.* 253: 345-353.
- Pradhan et al., 1997 : Pradhan, D., Krahling, S., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1997) Multiple systems for recognition of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Mol.Biol.Cell* 8 (5) , 767-778.
- Price et al., 1996 : Price, B. E., Rauch, J., Shia, M. A., Walsh, M. T., Lieberthal, W., Gilligan, H. M., O'Laughlin, T., Koh, J. S., and Levine, J. S. (1996) Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner. *J.Immunol.* 157 (5) , 2201-2208.
- Prinz et al., 1999 : Prinz, M., Kann, O., Draheim, H. J., Schumann, R. R., Kettenmann, H., Weber, J. R., and Hanisch, U. K. (1999) Microglial activation by components of gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58 (10) , 1078-1089.
- Raff et al., 1993 : Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262 (5134) , 695-700.
- Raivich et al., 1991 : Raivich G., Gehrman J. und Kreutzberg G.W. (1991) Increase of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in the regenerating rat facialis nucleus. *J.Neurosci.Res.* 30: 682-686.
- Ren und Savill, 1995 : Ren, Y. and Savill, J. (1995) Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J.Immunol.* 154 (5) , 2366-2374.
- Ren und Savill, 1998 : Ren, Y. and Savill, J. (1998) Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death.Differ.* 5 (7) , 563-568.
- Ren et al., 1995 : Ren Y., Silverstein R.L. Allen J. und Savill J. (1995) CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J.Exp.Med.* 181: 1857-1862.

- Richardson et al., 1993: Richardson A., Hao C. und Federoff S. (1993) Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7: 25-33
- Rigotti et al., 1995 : Rigotti, A., Acton, S. L., and Krieger, M. (1995) The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J.Biol.Chem.* 270 (27) , 16221-16224.
- Roelofsen und Op den Kamp, 1994 : Roelofsen, B. and Op den Kamp, A. F. (1994) Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry and Its Maintenance: The Human Erythrocyte as a Model. *Current Topics in Membranes* 40 , 7-39.
- Rubartelli et al., 1997 : Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M. R. (1997) The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur.J.Immunol.* 27 (8) , 1893-1900.
- Sambrano und Steinberg, 1995 : Sambrano, G. R. and Steinberg, D. (1995) Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92 (5) , 1396-1400.
- Savill 1997 : Savill, J. (1997) Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br.Med.Bull.* 53 (3) , 491-508.
- Savill et al., 1990 : Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343 (6254) , 170-173.
- Savill et al., 1993 : Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol.Today* 14 (3) , 131-136.
- Savill et al., 1992 : Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., and Haslett, C. (1992) Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J.Clin.Invest.* 90 (4) , 1513-1522.
- Savill et al., 1989 : Savill, J. S., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989) Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J.Clin.Invest.* 84 (5) , 1518-1527.
- Schwartz et al., 1985 : Schwartz, R. S., Tanaka, Y., Fidler, I. J., Chiu, D. T., Lubin, B., and Schroit, A. J. (1985) Increased adherence of sickled and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to cultured human peripheral blood monocytes. *J.Clin.Invest.* 75 (6) , 1965-1972.

- Segal et al., 1997 : Segal, R. A., Rua, L., and Schwartz, P. (1997) Neurotrophins and programmed cell death during cerebellar development. *Adv.Neurol.* 72 , 79-86.
- Selmaj et al., 1991 : Selmaj, K., Raine, C. S., Farooq, M., Norton, W. T., and Brosnan, C. F. (1991) Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J.Immunol.* 147 (5) , 1522-1529.
- Sloviter et al., 1993 : Sloviter, R. S., Sollas, A. L., Dean, E., and Neubort, S. (1993) Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the rat hippocampal dentate gyrus: characterization of an in vivo model of controlled neuronal death. *J.Comp.Neurol.* 330 (3) , 324-336.
- Stefanis et al., 1997 : Stefanis L., Burke R.E. und Greene L.A. (1997) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr.Opin.Neurol.* 10: 299-305.
- Stephan et al., 2000 : Stephan, H, Polzar, B., and Mannherz, H. G. (2000) Sein oder nicht sein? *Naturwissenschaftliche Rundschau* 624 , 273-281.
- Streit, W. J., 1990 : Streit, W. J. (11-1990) An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J.Histochem.Cytochem.* 38 (11) , 1683-1686.
- Streit 1995 : Streit, W. J. (1995) *Microglial cells.* (5) , 85-96. New York , Oxford University Press.
- Streit und Kincaid Colton, 1995 : Streit, W. J. and Kincaid Colton, C. A. (1995) The brain's immune system. *Sci.Am.* 273 (5) , 54-5,58-61.
- Terpstra et al., 1997 : Terpstra V., Kondratenko N. und Steinberg D. (1997) Macrophages lacking scavenger receptor A show a decrease in binding and uptake of acetylated low-density lipoprotein and of apoptotic thymocytes, but not of oxidatively damaged red blood cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 8127-8131
- Trauth und Keesey, 1995 : Trauth, B. C. and Keesey, J. (1995) *Guide to cell proliferation and apoptosis methods.* , Boehringer Mannheim GmbH.
- van den Eijnde et al., 1998 : van den Eijnde, S. M., Boshart, L., Baehreche, E. H., De Zeeuw, C. I., Reutelingsperger, C. P., and Vermeij Keers, C. (1998) Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* 3 (1)
- van Engeland et al., 1998 : van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31 (1) , 1-9.

- van Meer et al., 1981 : van Meer, G., Gahmberg, C. G., Op-den, Kamp JA, and van, Deenen LL. (1981) Phospholipid distribution in human En(a-) red cell membranes which lack the major sialoglycoprotein, glycophorin A. FEBS Lett. 135 (1) , 53-55.
- Vincent und Maiese, 1999 : Vincent, A. M. and Maiese, K. (1999) Direct temporal analysis of apoptosis induction in living adherent neurons. J.Histochem.Cytochem. 47 (5) , 661-672.
- Walker und Sirkorska, 1997 : Walker P.R. und Sirkorska M. (1997) New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. Biochem.CellBiol. 75: 287-299
- Walz et al., 1993 : Walz, W., Ilschner, S., Ohlemeyer, C., Banati, R., and Kettenmann, H. (1993) Extracellular ATP activates a cation conductance and a K⁺ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. J.Neurosci. 13 (10) , 4403-4411.
- Waters 1996 : Waters, C. M. (1996) Mechanisms of neuronal cell death. An overview. Mol.Chem.Neuropathol. 28 (1-3) , 145-151.
- Wekerle 1995 : Wekerle H. (1995) Antigen presentation by central nervous system glia. In: Neuroglia (KettenmannH, Ransom BR eds), 685-699. New York: Oxford University Press.
- Weller et al., 1997 : Weller M., Schulz J.B., Wullner U., Loschmann P.A., Klockgether T. und Dichgans J. (1997) Developmental and genetic regulation of programmed neuronal death. J.Neural transm.Suppl. 50: 115-123.
- Wu et al., 1994 : Wu, C. H., Wen, C. Y., Shieh, J. Y., and Ling, E. A. (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. J.Neurocytol. 23 (4) , 258-269.
- Wu und Horvitz, 1998 : Wu, Y. C. and Horvitz, H. R. (1998) The C. elegans cell corpse engulfment gene ced-7 encodes a protein similar to ABC transporters. Cell 93 (6) , 951-960.
- Zielasek und Hartung, 1996 : Zielasek, J. and Hartung, H. P. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. Adv.Neuroimmunol. 6 (2) , 191-122.
- Zwaal und Schroit, 1997 : Zwaal, R. F. and Schroit, A. J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood 89 (4) , 1121-11

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Merkmale des apoptotischen und nekrotischen Zelltods. ..	11
Abbildung 2: Verschiedene Erkennungsmechanismen, die zur Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Phagozyten führen können.....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Chemotaxisansatzes	37
Abbildung 4: Für Apoptose spezifische morphologische Veränderungen der Kleinhirnneurone nach einer SNOC-Behandlung.	44
Abbildung 5: ApopTag-positive Kleinhirnneurone nach einer Behandlung mit 100 μ M SNOC.	45
Abbildung 6: Apoptotischer und nekrotischer Zelltod in den Körnerzellen des Kleinhirns nach einer Behandlung mit 100 μ M S-Nitroso-L-Cystein.	47
Abbildung 7: Phosphatidylserin wird im Verlauf der SNOC induzierten Apoptose früh auf der Oberfläche der Neurone präsentiert.	49
Abbildung 8: Kulturüberstände von apoptotischen Neurone besitzen keine chemotaktische Wirkung auf Mikroglia.....	51
Abbildung 9: Video Zeitraffer Aufnahmen von Mikrogliazellen, die zu apoptotischen Neuronen gegeben wurden.	52
Abbildung 10: Die Bindung/Phagozytose von Neuronen durch Mikrogliazellen nimmt in Kokultur mit SNOC-behandelten Neuronen zu.	54
Abbildung 11: Effekt von Monosacchariden auf die Phagozytose apoptotischer Körnerzellen des Kleinhirns durch Mikroglia.....	57
Abbildung 12: RGDS Peptide inhibieren die Phagozytose von apoptotischen Kleinhirnneuronen durch Mikroglia.....	58
Abbildung 13: Der inhibitorische Effekt von O-Phospho-L-Serin auf die Mikroglia Phagozytose von apoptotischen Kleinhirnneuronen.	60
Abbildung 14: Mikrogliazellen binden und phagozytieren Lipidvesikel, die Phosphatidylserin enthalten.....	63
Abbildung 15: Bindung von PS-LUVs durch Astrozyten:.....	65
Abbildung 16: Zeitabhängige Bindung der Phosphatidylserin-LUVs an Mikrogliazellen.	67
Abbildung 17: Konzentrationsabhängigkeit der Phosphatidylserinbindung.	69
Abbildung 18: Die Bindung der PS-LUVs ist unabhängig vom Aktivierungszustand der Mikrogliazellen.	71
Abbildung 19: Eine Inkubation der Mikrogliazellen mit Lipidvesikeln führt nicht zu einer Stimulation der Zytokin/Chemokin- Sekretion	72
Abbildung 20: Die Bindung von PS-LUVs induziert Kalziumsignale in Mikrogliazellen.	74
Abbildung 21: PS-LUVs induzieren ein Kalziumsignal in Mikrogliazellen	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neutralrot Test zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Mikroglia in der Anwesenheit der löslichen Inhibitoren.....	61
---	----

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
$\alpha_v\beta_3$	Vitronektinrezeptor
ABC-1	ATP binding cassette-1
APL	Antiphospholipid-Antikörpersyndrom
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovine serum albumin
C5a	Komplement 5a
C3a	Komplement 3a
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno Sorbent Assay
FITC	Fluorescein-iso-thiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
Fuk	Fukose
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxymethyl-Ester
Gal	Galaktose
GalNac	N-Acetylgalaktosamin
Glu	Glukose
GM-CSF	Granulozyt-Makrophagen-kolonie-stimulierender Faktor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPR	Horseradish peroxidase conjugated Streptavidin

ICAM-3	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-3
IL	Interleukin
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LUVs	Large unilamellar vesicles
Man	Mannose
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mip1- α	Macrophage inflammatory protein-1-alpha
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMRI	Naval Medical Research Institute
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
NR	Neutralrot
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4/5	Neurotrophin 4/5
OPS	O-Phospho-L-Serin
PBS	Phosphatpuffer
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Propidiumjodid
PLL	Poly-L-Lysin
PNS	Peripheres Nervensystem
PS	Phosphatidylserin
RGD	Argenin-Glycin-Asparagin
RGDS	Argenin-Glycin-Asparagin-Serin
RGES	Argenin-Glycin-Glutamin-Serin
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SNOC	S-Nitroso-L-Cystein
SR-A	Scavenger Rezeptor der Klasse A

TdT	Deoxynukleotidyltransferase
TGFβ1	Transforming growth factor beta 1
TMP	Tetramethybenzidin
TNF-α	Tumor-necrosis factor alpha
TSP1	Thrombospondin-1
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Persönliche Daten

Anke Witting

Geb. 14.03.1972 in Barßel

Schulausbildung

07/84-07/91

Albertus-magnus-gymnasium, Friesoythe

Abschluß: Abitur

Studium

10/91-05/97

Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky
Universität Oldenburg

Schwerpunkt: Molekulare Zellbiologie

Abschluß: Diplom

05/97-10/2000

Doktorarbeit am Max-Delbrück-Centrum, Berlin in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kettenmann

Nebentätigkeit

11/1996-12/1996

Tutorientätigkeit (Betreuung des Patrikums: „Biochemie
des Nervensystems“) Biologische Fakultät der Carl von
Ossietzky Universität Oldenburg

Kurse

01/1998

Teilnahme an dem Hirnkurs am Institut für Anatomie
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität
(Charité Berlin)

Stipendien

07/1998-12/1999

Stipendium der Schering Forschungsgesellschaft

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den 19.07.2000

Anke Witting

Publikationen und Posterbeiträge

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation entstanden folgende Publikationen und Posterbeiträge:

Publikationen

Witting A., Müller P., Herrmann A., Kettenmann H. und Nolte C. (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro: involvement of lectin, integrin and phosphatidylserine mediated recognition. J.Neurochem. (im Druck)

Posterpräsentation beim 29th annual meeting of the society for Neuroscience 1999 in Miami Beach, Florida, USA

Witting A., Herrmann A., Müller P., Kettenmann H. und Nolte C. (1999)

Recognition of apoptotic neurons by microglial cells.